

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOCHEMIE



**Vliv inhibitoru histondeacetylas valproátu na aktivity
a expresi cytochromů P450 a peroxidas oxidujících
ellipticin**

**The effect of histone deacetylase inhibitor valproate on activity
and expression of cytochromes P450 and peroxidases oxidizing ellipticine**

Diplomová práce

Markéta Göttlicherová

Školitelka: Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha 2010

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením Prof. RNDr. Marie Stiborové, DrSc. a všechny prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne

.....

Markéta Göttlicherová

Ráda bych poděkovala své školitelce Prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za zadání tématu, odborné vedení, cenné rady, všestrannou pomoc a laskavý přístup při vypracování této práce.

Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Michaela Moserové za objasnění experimentálních přístupů, odborné rady a trpělivost.

Děkuji také celému kolektivu laboratoře za ochotnou pomoc při práci a vytváření příjemného pracovního prostředí.

Abstrakt

Ellipticin je účinné protinádorové léčivo, jehož mechanismus působení je založen především na interkalaci do DNA a inhibici topoisomerasy II. V naší laboratoři pak bylo zjištěno, že ellipticin tvoří kovalentní adukty s DNA po jeho enzymové aktivaci cytochromy P450 (CYP) a peroxidasami. V další studii byla pozorována zvýšená tvorba těchto aduktů ellipticinu s DNA neuroblastomových buněk, která korelovala se zvýšenou cytotoxicitou ellipticinu vyvolanou inhibitorem histondeacetylasy valproátem (VPA). Toto pozorování lze vysvětlit několika mechanismy. Jedním z nich může být rozvolnění struktury chromatinu, a tím zpřístupnění DNA pro modifikaci. Druhým pak možnost ovlivnění aktivit a exprese enzymů metabolizujících ellipticin působením VPA. Tato diplomová práce se zaměřila na testování druhé hypotézy. Vzhledem k tomu, že VPA je metabolizován podobnými enzymy jako ellipticin, zaměřili jsme se na sledování vlivu VPA (i) na oxidaci ellipticinu cytochromy P450 a peroxidasami, (ii) na aktivity CYP, které významně participují na oxidaci ellipticinu (CYP1A, CYP3A) a (iii) na expresi enzymů oxidujících ellipticin (CYP1A1, CYP3A4, laktoperoxidasa). Oxidace ellipticinu modelovou peroxidasou *in vitro* (křénovou peroxidasou) na detoxikační metabolit, dimer ellipticinu, byla signifikantně stimulována VPA, zatímco na tvorbu metabolitů ellipticinu cytochromy P450 a laktoperoxidasou vliv VPA nebyl pozorován. VPA neovlivňuje ani aktivity CYP1A1, CYP1A2 a CYP3A. Ellipticin indukoval expresi CYP1A1 a CYP3A4 v neuroblastomových buněčných liniích UKF-NB-3 a UKF-NB-4. Tato jejich indukovaná exprese byla dále pouze slabě potencována působením VPA v případě CYP1A1, v případě CYP3A4 však dále prohlubována nebyla. Exprese laktoperoxidasy byla v obou neuroblastomových buněčných liniích snížena, a to jak ellipticinem, tak i VPA.

Abstract

Ellipticine is a potent antineoplastic agent, whose mode of action is considered to be based mainly on DNA intercalation and inhibition of topoisomerase II. Ellipticine was also found to form covalent DNA adducts mediated by its enzymatic activation with cytochromes P450 (CYP) and peroxidases. The next study demonstrated increasing formation of these ellipticine-DNA adducts by histone deacetylase inhibitor valproate (VPA) in neuroblastoma cells. This phenomenon correlates with increasing cytotoxicity of ellipticine induced by this histone deacetylase inhibitor. This observation can be explained by several mechanisms. One of them can be loosening the structure of chromatine, which leads to accessing DNA for modification. Another one is the effect of VPA on activities and expression of enzymes metabolizing ellipticine. This study was aimed to test the second hypothesis. Since VPA has been shown to be metabolized by similar enzymes as ellipticine is, we have studied the effect of VPA (i) on oxidation of ellipticine by cytochromes P450 and peroxidases, (ii) on activities of the CYP enzymes, which significantly participate in oxidation of ellipticine (CYP1A, CYP3A) and (iii) on expression of enzymes oxidizing ellipticine (CYP1A1, CYP3A4, lactoperoxidase). Oxidation of ellipticine *in vitro* by model peroxidase (horseradish peroxidase) leading to detoxication metabolite, ellipticine dimer, was significantly stimulated by VPA, whereas no effect of VPA on generating of metabolites of ellipticine by CYPs and lactoperoxidase was observed. VPA has also no effects on activities of CYP1A1, CYP1A2 and CYP3A. Ellipticine induces expression of CYP1A1 and CYP3A4 in UKF-NB-3 and UKF-NB-4 neuroblastoma cell lines. This induced expression is moderately increased by VPA in the case of CYP1A1, but VPA had no effects on the ellipticine-mediated CYP3A4 induction. Expression of lactoperoxidase by ellipticine and VPA is decreased in both two neuroblastoma cell lines analyzed in the study.

OBSAH

| | |
|---|-----------|
| Seznam použitých zkratk..... | 9 |
| 1 ÚVOD..... | 11 |
| 1.1 NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ A JEJICH TERAPIE | 11 |
| 1.1.1 MECHANISMUS KANCEROGENEZE | 11 |
| 1.1.2 PATOGENEZE VZNIKU ZHOUBNÝCH NÁDORŮ | 13 |
| 1.1.3 PROTINÁDOROVÁ CHEMOTERAPIE..... | 14 |
| 1.1.3.1 Mechanismus účinku cytostatik..... | 15 |
| 1.1.4 FARMAKOKINETIKA LÉČIV..... | 16 |
| 1.2 BIOTRANSFORMACE LÉČIV | 18 |
| 1.2.1 CYTOCHROMY P450..... | 19 |
| 1.2.1.1 Regulace exprese cytochromů P450 indukci..... | 25 |
| 1.2.2 PEROXIDASY | 26 |
| 1.2.2.1 Laktoperoxidasa | 29 |
| 1.2.2.2 Křenová peroxidasa | 30 |
| 1.3 ELLIPTICIN | 31 |
| 1.4 INHIBITORY HISTONDEACETYLAS | 37 |
| 1.4.1 VALPROÁT | 41 |
| 1.5 NEUROBLASTOMY A JEJICH OVLIVNĚNÍ ELLIPTICINEM A VPA | 43 |
| 2 CÍL PRÁCE..... | 45 |
| 3 MATERIÁL A METODY | 46 |
| 3.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE | 46 |
| 3.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE..... | 48 |
| 3.3 METODY | 49 |
| 3.3.1 STUDIUM VLIVU VPA NA OXIDACI ELLIPTICINU CYTOCHROMY P450 | 49 |
| 3.3.1.1 Separace metabolitů ellipticinu tvořených jaterními mikrosomálními systémy kontrolních (nepremedikovaných) potkanů pomocí HPLC..... | 49 |
| 3.3.1.2 Separace metabolitů ellipticinu tvořených jaterními mikrosomálními systémy potkanů premedikovaných Sudanem I pomocí HPLC | 50 |
| 3.3.1.3 Separace metabolitů ellipticinu tvořených jaterními mikrosomálními systémy potkanů premedikovaných PCN pomocí HPLC..... | 50 |

| | |
|--|-----------|
| 3.3.2 SLEDOVÁNÍ VLIVU VPA NA AKTIVITY CYTOCHROMŮ P450 PODRODIN 1A A 3A | 51 |
| 3.3.2.1 Separace metabolitů Sudanu I pomocí HPLC | 51 |
| 3.3.2.2 Separace metabolitu testosteronu tvořeného jaterními mikrosomálními systémy kontrolních (nepremedikovaných) potkanů pomocí HPLC..... | 52 |
| 3.3.2.3 Separace metabolitů testosteronu tvořených jaterními mikrosomálními systémy potkanů premedikovaných PCN pomocí HPLC..... | 53 |
| 3.3.2.4 Sledování methoxyresorufin <i>O</i> -demethylační aktivity fluorimetricky | 53 |
| 3.3.3 STUDIUM VLIVU VPA NA OXIDACI ELLIPTICINU PEROXIDASAMI..... | 54 |
| 3.3.3.1 Separace dimeru ellipticinu tvořeného laktoperoxidasou pomocí HPLC..... | 55 |
| 3.3.3.2 Separace dimeru ellipticinu tvořeného křenovou peroxidase pomocí HPLC..... | 56 |
| 3.3.4 VLIV VPA NA EXPRESI ENZYMŮ METABOLIZUJÍCÍCH ELLIPTICIN V NEUROBLASTOMOVÝCH BUNĚČNÝCH LINIÍCH | 56 |
| 3.3.4.1 Extrakce proteinů z buněčných linií | 57 |
| 3.3.4.2 SDS-elektroforesa..... | 57 |
| 3.3.4.3 Western blotting | 57 |
| 3.3.5 STUDENTŮV T-TEST | 58 |
| 4 VÝSLEDKY..... | 59 |
| 4.1 VLIV VPA NA OXIDACI ELLIPTICINU CYTOCHROMY P450 JATERNÍCH MIKROSOMÁLNÍCH SYSTÉMŮ POTKANŮ | 59 |
| 4.1.1 VLIV VPA NA OXIDACI ELLIPTICINU CYTOCHROMY P450 JATERNÍCH MIKROSOMÁLNÍCH SYSTÉMŮ KONTROLNÍCH (NEPREMEDIKOVANÝCH) POTKANŮ | 59 |
| 4.1.2 VLIV VPA NA OXIDACI ELLIPTICINU CYTOCHROMY P450 JATERNÍCH MIKROSOMÁLNÍCH SYSTÉMŮ POTKANŮ PREMEDIKOVANÝCH SUDANEM I..... | 61 |
| 4.1.3 VLIV VPA NA OXIDACI ELLIPTICINU CYTOCHROMY P450 JATERNÍCH MIKROSOMÁLNÍCH SYSTÉMŮ POTKANŮ PREMEDIKOVANÝCH PCN..... | 63 |
| 4.2 VLIV VPA NA AKTIVITY CYTOCHROMŮ P450 PODRODIN 1A A 3A MĚŘENÉ S JEJICH SPECIFICKÝMI („MARKEROVÝMI“) SUBSTRÁTY | 65 |
| 4.2.1 VLIV VPA NA OXIDACI SUDANU I CYTOCHROMEM P450 1A1 | 65 |
| 4.2.2 VLIV VPA NA 6-B-HYDROXYLACI TESTOSTERONU KATALYZOVANOU CYTOCHROMY 450 PODRODINY 3A ZA POUŽITÍ JATERNÍCH MIKROSOMÁLNÍCH SYSTÉMŮ KONTROLNÍCH (NEPREMEDIKOVANÝCH) POTKANŮ | 66 |
| 4.2.3 VLIV VPA NA 6-B-HYDROXYLACI TESTOSTERONU KATALYZOVANOU CYTOCHROMY P450 PODRODINY 3A ZA POUŽITÍ JATERNÍCH MIKROSOMÁLNÍCH SYSTÉMŮ POTKANŮ PREMEDIKOVANÝCH PCN | 68 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2.4 Vliv VPA na <i>O</i> -DEMETHYLACI 7-METHOXYRESORUFINU KATALYZOVANOU CYTOCHROMEM P450 1A2 | 69 |
| 4.3 Vliv VPA na OXIDACI ELLIPTICINU PEROXIDASAMI | 71 |
| 4.3.1 Vliv VPA na OXIDACI ELLIPTICINU LAKTOPEROXIDASOU | 71 |
| 4.3.2 Vliv VPA na OXIDACI ELLIPTICINU KŘENOVOU PEROXIDASOU | 72 |
| 4.4 Vliv VPA na EXPRESI ENZYMŮ METABOLIZUJÍCÍCH ELLIPTICIN V NEUROBLASTOMOVÝCH BUNĚČNÝCH LINIÍCH | 74 |
| 4.4.1 Vliv ELLIPTICINU A VPA na EXPRESI CYTOCHROMU P450 1A1 v NEUROBLASTOMOVÝCH BUNĚČNÝCH LINIÍCH | 74 |
| 4.4.2 Vliv ELLIPTICINU A VPA na EXPRESI CYTOCHROMU P450 3A4 v NEUROBLASTOMOVÝCH BUNĚČNÝCH LINIÍCH | 75 |
| 4.4.3 Vliv ELLIPTICINU A VPA na EXPRESI LAKTOPEROXIDASY v NEUROBLASTOMOVÝCH BUNĚČNÝCH LINIÍCH | 76 |
| 5 DISKUSE | 78 |
| 6 ZÁVĚR | 82 |
| Seznam použité literatury..... | 83 |

Seznam použitých zkratek

| | |
|---------------------------|--|
| A/ AH•/ AH ₂ | oxidovaný produkt/ radikál substrátu/ redukční substrát peroxidasy |
| AH-AH (A-A) | dimer substrátu peroxidasy |
| AhR | receptor pro aromatické uhlovodíky („aryl hydrocarbon receptor“) |
| Arnt | „AhR nuclear translocator“ |
| bHLH | „basic helix-loop-helix“ |
| BIS | <i>N,N'</i> -methylen-bis-akrylamid |
| CAR | „constitutive androstane receptor“ |
| CoA | koenzym A |
| COX | cyklooxygenasa |
| CYP | cytochrom P450 |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| DRE | „dioxin-responsive element“ |
| FAD | flavinadenindinukleotid |
| FMN | flavinmononukleotid |
| HAT | histonacetyltransferasa |
| HDAC | histondeacetylase |
| HRP | křenová peroxidasa |
| hsp90 | protein indukovaný tepelným šokem („heat shock protein 90“) |
| Ig | imunoglobulin |
| IMDM | „Iscoe's modified Dulbecco's medium“ |
| IMR-32 | lidská neuroblastomová buněčná linie |
| LPO | laktoperoxidasa |
| MeOH | methanol |
| MFO | system monooxygenas se smíšenou funkcí („mixed function oxygenases“) |
| MPO | myeloperoxidasa |
| MROD | methoxyresorufin- <i>O</i> -demethylase |
| NAD ⁺ (NADH) | nikotinamidadenindinukleotid oxidovaný (redukovaný) |
| NADP ⁺ (NADPH) | nikotinamidadenindinukleotidfosfát oxidovaný (redukovaný) |
| PBS | sodný fosfátový pufr s obsahem NaCl – izotonický roztok („Phosphate Buffer with Salt“) |

| | |
|----------|--|
| PCN | pregnenolon-16 α -karbonitril |
| PPAR | „peroxisome proliferator-activated receptor“ |
| PXR | „pregnane X receptor“ |
| R'OH | alkohol vzniklý redukcí hydroperoxidu |
| R'OOH | hydroperoxid |
| Rb | „retinoblastoma protein“ |
| RH/ ROH | redukovaný substrát/ hydroxylovaný produkt cytochromu P450 |
| RP-HPLC | vysokoučinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi („reversed phase high-pressure liquid chromatography“) |
| RPM | počet otáček za minutu |
| RXR | „retinoid X receptor“ |
| SAHA | kyselina suberoylanilidhydroxamová („suberoylanilide hydroxamic acid“) |
| SDS | dodecylsulfát sodný |
| SK-N-AS | lidská neuroblastomová buněčná linie |
| TEMED | <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl-ethylendiamin |
| TRIS | tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| Triton | <i>t</i> -oktylfluoxypolyetoxyethanol |
| TSA | trichostatin A |
| UKF-NB-3 | lidská neuroblastomová buněčná linie |
| UKF-NB-4 | lidská neuroblastomová buněčná linie |
| v/v | objem/objem |
| VPA | kyselina valproová |

značení aminokyselin je provedeno standardními třípísmennými zkratkami

1 ÚVOD

1.1 Nádorová onemocnění a jejich terapie

Rakovina je obecný pojem. Zahrnuje celou řadu onemocnění se vznikem nádorů nezhoubných (benigních) a zhoubných (maligních). **Benigní nádory** rostou pomalu, bývají přesně ohraničené od normální tkáně a netvoří metastázy. **Maligní nádory** rostou rychle, metastázuji a prorůstáním do okolní tkáně způsobují její destrukci.^[1]

Zhoubné nádory dělíme podle tvaru na solidní (pevné) a liquidní („tekuté“). 95% všech nádorů jsou solidní, tzn. rostou jako pevná ložiska. „Tekuté“ nádory jsou leukémie, tj. „malignace“, které jsou rakovinou krve. Podle druhu tkání, z nichž vznikají, dělíme zhoubné nádory na karcinomy, sarkomy a germinální nádory. **Karcinomy** se vyskytují nejčastěji. Vznikají z epitelálních buněk výstelek dutých orgánů nebo ze žlázových buněk, které tvoří parenchymatózní orgány a žlázy. Jedná se o játra, ledviny, plíce, slinivku břišní, štítnou žlázu, mléčnou žlázu prsu a prostatu. **Sarkomy** jsou zhoubné nádory, které vycházejí z pojivových tkání. Jedná se o buňky vaziva, svaloviny, kloubní výstelky, chrupavky či kostí. Sarkomy tvoří asi 1% zhoubných nádorů. Vyskytují se kdekoli v těle, dorůstají značné velikosti a hmotnosti i několika kilogramů. **Germinální nádory** vycházejí ze zárodečných tkání, tj. varlat a vaječníků. Vyskytují se spíše v mladším věku. Jsou velmi agresivní a rychle se šíří. Germinální nádory tvoří asi 0,01% všech zhoubných nádorů.^[2]

1.1.1 Mechanismus kancerogeneze

Všechna nádorová onemocnění jsou způsobena poškozením genomu.^[3] Mutace v genech hrají roli při vzniku jak sporadických, tak i dědičných forem nádorových onemocnění. Vznik nádorového onemocnění je vždy mnohastupňový proces kumulace mutačních změn genů. Tento řetězec je většinou spuštěn v buňce naprosto náhodně, v důsledku stárnutí organismu a nedostatečnosti reparace spontánně vzniklých chyb v DNA, v důsledku nadměrné expozice kancerogenům nebo v důsledku dalších, zatím neznámých, faktorů.^[4]

Vzniku a vývoje nádoru se účastní hlavně geny ovlivňující buněčný cyklus a opravy chyb v DNA. Jedná se o onkogeny, tumorové supresorové geny a geny pro reparační systémy. **Onkogeny** jsou mutovanou formou protoonkogenů, které mají za úkol regulovat buněčné dělení a diferenciaci. Při mutaci v onkogeny je exprese genu zvýšena, což má

za následek vyšší produkci různých růstových faktorů, stimulaci buněčného dělení, a tím tvorbu nádoru. **Tumorové supresorové geny** kontrolují buněčný cyklus a přerušují dělení buňky v případě poškození její DNA. To umožní opravu DNA a další dělení až tehdy, kdy je DNA v pořádku. Dojde-li však k mutaci v těchto genech, pak buňka ztrácí schopnost správně reagovat na inhibiční signály a pokračuje v proliferaci. To má za následek rychlejší buněčnou kumulaci mutací a vznik nádoru. **Geny pro reparační systémy** jsou potřebné k opravě spontánně vzniklých chyb v DNA. Poškození těchto genů vede ke snadnému a rychlému nahromadění chyb v DNA.^[3]

Zdá se, že klíčovou úlohu při vzniku různých druhů nádorových onemocnění hraje supresorový gen *p53*. Je přítomen v mutované formě až v 60% případů všech nádorů člověka. Při jeho inhibici se netvoří protein p21, který za normálních okolností inhibuje tvorbu komplexu mezi cykliny a cyklin-dependentními kinasami, a tím brání fosforylaci proteinu Rb, která je nezbytná pro přechod buněk do S fáze. Zastavení buněk před vstupem do S fáze je velmi důležité, protože poskytne buňkám dostatek času na reparaci poškozené DNA. V případě, že poškození DNA je příliš rozsáhlé a není opraveno v průběhu G1 fáze, funkční protein p53 navodí programovanou buněčnou smrt takto poškozených buněk aktivací genů indukujících apoptózu.^[5]

Poškození genomu může být vyvoláno také celou řadou faktorů. Tyto faktory lze třídit do tří skupin: chemické, fyzikální a biologické.

Chemické faktory zahrnují celou řadu chemikálií, které jsou kancerogenní. Takové sloučeniny se po vstupu do těla a buněk vážou k různým cílovým molekulám, čímž je mění a poškozují. Jedná se např. o aflatoxin vytvářený plísní *Aspergillus flavus*, která roste na nesprávně skladovaných arašidech nebo obilí. Již minimální dávky této látky způsobují nádory jater.^[6]

Mezi **fyzikální faktory** patří různé druhy záření, např. UV záření, které způsobuje poškození buněk kůže. Konkrétně tvorbu pyrimidinových dimerů v DNA. Pokud nejsou odstraněny před replikací, mohou vést k chybnému přepisu DNA a nahromadění mutací. Důsledkem mohou být až agresivní a obtížně léčitelné melanomy.^[6]

Mezi **biologické faktory** patří viry, např. virus hepatitidy se může podílet na vzniku nádorů jater a papilomaviry na vzniku nádorů děložního hrdla.^[2] Virové částice se vážou na povrch buňky a vnášejí své geny dovnitř této buňky. V cytosolu se spustí složitý děj, jehož výsledkem je replikace virového genomu, syntéza jeho kapsidy a složení nových

virových částic. Zároveň s virovými částicemi se aktivně transkribuje i genetický materiál hostitelské buňky. Tím se produkuje nadbytek buněk, které pak mohou vytvořit masu nádoru.^[6]

1.1.2 Patogeneze vzniku zhoubných nádorů

Maligní transformace buňky a vývoj nádoru bez ohledu na jeho příčinu probíhají stupňovitě a jsou velmi dlouhodobé. Celý proces malignizace normální tkáně je dán postupnými změnami genotypu a jimi korespondujícími fenotypickými změnami transformované buněčné populace.^[5] K rozvoji plně maligního fenotypu je nezbytná kumulace mnoha genetických nebo epigenetických změn v buňce.^[4]

Podle fenotypických projevů všech buněk nádoru v daném momentu procesu malignizace můžeme celý dlouhodobý vývoj vzniku nádoru obecně rozdělit do tří fází. Je to fáze indukce, fáze blastoma *in situ* a fáze progresu nádoru. Jednotlivé fáze se dále dělí do charakteristických etap.^[5]

1. **Indukční fáze** trvá 15-30 let a dá se z patogenetického hlediska rozdělit na etapu iniciace, latence a promoce.^[5]

- a) Etapa iniciace nádorového zvratu buňky – jedná se o změnu genotypu buňky, která je nejčastěji podmíněna mutací. Změněná buňka je označována jako buňka iniciovaná. Iniciace je indukovaná celou řadou genetických změn. Tyto změny jsou vyvolány faktory, které se nazývají iniciátory. Po iniciační mutaci dochází ve většině případů k opravě vzniklé chyby nebo je buňka natolik poškozená, že spontánně zaniká.
- b) Etapa latence – je individuálně dlouhá a představuje časový úsek, ve kterém může pokračovat působení iniciátoru, ale může docházet i k eliminaci iniciovaných buněk.
- c) Etapa promoce – vyžaduje dlouhý účinek promotoru, což může být např. kancerogenní látka, působení růstových faktorů nebo hormonů. Promotor je látka, která bez předchozí iniciace sama nádorovou přeměnu neindukuje. Jeho funkce spočívá především ve stimulaci dělení iniciované buňky. Zvětšením intenzity proliferace dochází ke zvětšení počtu mitóz, a tím ke zvýšení pravděpodobnosti fixace genetické chyby.

Dále vznikají také výhodné podmínky pro vznik dalších genetických změn.

2. ***Fáze blastoma in situ*** trvá 5-10 let a z hlediska patologické morfologie patří ještě do období preneoplastického. Dochází při ní k postupné selekci atypických buněk s již plnou genotypickou charakteristikou maligního nádoru, ale ještě s neúplně funkčně vyjádřeným maligním fenotypem. Chybí zejména schopnost invazivního růstu a metastatické diseminace.^[5]
3. ***Fáze progrese*** se dá rozdělit na etapu invaze a diseminace.^[5]
 - a) *Etapa invaze* – trvá 1-3 roky a je charakterizována lokálním infiltrativním nebo destruktivním růstem bez diseminace.
 - b) *Etapa diseminace* – trvá 1-5 let a je pro ni charakteristický metastatický rozsev.

1.1.3 Protinádorová chemoterapie

Při léčení nádorů se v závislosti na typu a stádiu onemocnění uplatňuje léčba chirurgická, fyzikální (ozařování, neutronová záchytná terapie), chemoterapie a imunoterapie. Nejčastěji se uvedené terapeutické postupy kombinují.^[1]

Protinádorová chemoterapie je považována od poloviny 60.let minulého století za jednu ze základních metod léčby nádorových onemocnění. Jedná se o systémovou léčbu, kdy se vpravují do těla, intravenózně nebo perorálně, cytostatika, což jsou látky, které omezují dělení buněk a zasahují do jejich metabolických procesů. Prostřednictvím krevního oběhu se dostávají do všech částí těla, proto je jejich užívání vhodné i při léčbě leukémií a metastáz. Nevýhodou této léčebné metody je to, že není schopna selektivně ničit pouze nádorové buňky, ale dochází i k poškození buněk zdravých.^[7] Selektivita účinku cytostatik je řízena pouze „kineticky“. Nádorové buňky se dělí a rostou rychleji než buňky normální, a proto jsou citlivější vůči jejich zásahu. Při chemoterapii zhoubných nádorů jde tedy o hledání kompromisu mezi terapeutickým ziskem a poškozením pacienta toxickými účinky cytostatik.^[1]

Problémy spojené se systémovou intoxikací organismu při chemoterapii nádorových onemocnění by vyřešilo selektivní působení cytostatik pouze na rakovinné buňky.^[1]

1.1.3.1 Mechanismus účinku cytostatik

Podle mechanismu účinku se cytostatika dělí na alkylační činidla, antimetabolity, antimitotika a další. Moderní protinádorová chemoterapie využívá rovněž inhibice některých enzymů specifických pro nádorové buňky, hlavně proteinkinas.^[1]

- Alkylační činidla – jejich působení spočívá v přenesení alkylových skupin na báze DNA. Modifikovaná DNA pak přestává plnit svoji funkci. Např. cyklofosamid.^[1]
- Antimetabolity – jedná se o strukturní analoga přirozených metabolitů, která jsou po vstupu do metabolického procesu schopná některý z jeho stupňů zablokovat. Pomocí antimetabolitů jsou nejsnáze ovlivnitelné procesy, které vedou k syntéze nukleotidů a nukleových kyselin. Největší význam v terapii nádorových onemocnění mají proto analoga kyseliny listové, která účinkuje při biosyntéze pyrimidinových a purinových bází (např. methotrexát) a antagonisté pyrimidinových a purinových nukleotidů, které také inhibují syntézu DNA/RNA nebo po svém zabudování do vlákna dokonce dávají vznik „falešným“ nukleovým kyselinám (např. 5-fluorouracil).^[1,8]
- Deriváty hormonů nebo jejich antagonisté – při léčení rakoviny ženských pohlavních orgánů a rakoviny prsu se často využívají syntetické estrogeny (např. diethylstilbestrol) a antiestrogeny (např. tamoxifen), které převážně interagují s estrogenními receptory. Naproti tomu inhibitory aromatasy ovlivňují přímo tvorbu estrogenu (např. exemestan). Při terapii nádorů, které jsou stimulovány testosteronem, jako je např. karcinom prostaty, se často používají antiandrogeny (např. bicalutamid).^[1]
- Interkalátory - také některá protinádorová antibiotika (např. doxorubicin) vykazují cytostatické účinky. Ukládají se (interkalují) do dvojitého řetězce DNA.^[1,8]
- Inhibitory proteinkinas – tyto látky inhibují některé proteinkinasy specifické pro nádorové buňky a brání tak jejich dělení. Např. imatinib.^[1]
- Inhibitory mitosy – mitotické vřeténko je tvořeno mikrotubuly, které vznikají polymerizací α - a β -tubulinu. Působením mitotického vřeténka se zdvojené chromozomy od sebe odtáhnou, než se buňky rozdělí. Poté jsou mikrotubuly

destruovány a uvolněné tubulinové podjednotky se využijí pro tvorbu nového dělicího vřeténka. Naváže-li se cytostatikum na tubulin, dochází k inhibici tvorby nebo rozpadu mitotických vřetének, a tím se zabrání dělení buněk. Např. vinkristin.^[4,8]

- *Inhibitory topoisomerasy II* – při interakci cytostatik s topoisomerasou II dochází k zabránění opětovného spojení řetězců DNA a v DNA se tak tvoří řetězové zlomy. Např. ellipticin.^[8]

1.1.4 Farmakokinetika léčiv

Farmakokinetika se zabývá osudem léčiv v organismu. Předmětem jejího studia jsou zejména procesy ovlivňující koncentraci léčiva v místě jeho zásahu a závislost této koncentrace na čase. Jde především o procesy:^[1]

- Absorpce léčiva po jeho podání
- Distribuce léčiva v organismu
- Metabolické přeměny léčiva
- Eliminace léčiva či jeho metabolitů

Absorpce zahrnuje procesy zajišťující v organismu pohyb látky z místa jejího podání do krevního oběhu. Absorpci léčiva a následně i jeho účinnost významným způsobem ovlivňuje léková forma (tuhá – tablety, želatinové tobolky, čípky, kapalná – injekce, infúze, kapky, roztoky, polotuhá – masti, krémy, gely) a způsob jejího podávání (perorálně, sublingválně, rektálně, intravenózně, intramuskulárně, subkutánně, topicky).^[1]

Distribuci léčiva v organismu významně ovlivňuje jeho vazba na proteiny krevní plazmy. Pouze volné, nevázané léčivo může podléhat farmakokinetickým procesům jako je biotransformace a eliminace. Vazba na proteiny krevní plazmy tak může limitovat koncentraci volného léčiva v cílové oblasti. Na druhé straně však komplex léčiva s proteinem představuje zásobní formu pro případ, že koncentrace volného léčiva z jakéhokoliv důvodu klesne.^[1]

Biotransformací léčiv vznikají látky lépe rozpustné ve vodě, a tím i snáze vyloučitelné z organismu. Při biotransformaci mohou vznikat metabolity, které vykazují stejný nebo podobný farmakologický účinek jako původní látka. Častější jsou však případy, kdy metabolická přeměna vede k neúčinné látce (detoxikace), nebo naopak k látce účinnější

(aktivace). Jsou známy i případy, kdy metabolickými přeměnami vzniká látka výrazně toxičtější než látka původní (např. přeměna methanolu na formaldehyd).^[1]

Eliminace léčiva se děje převážně močí nebo žlučí. Vylučování močí závisí jednak na extrarenálních faktorech (povaha látky, vazba na bílkovinu, biotransformace), jednak na faktorech renálních (glomerulární filtrace, tubulární sekrece). Nejsnáze se močí vylučují polární metabolity, kdežto lipofilní substance jsou většinou v tubulech zpětně resorbovány. Vylučování žlučí je časté u cytostatik s velkými molekulami.^[9]

1.2 Biotransformace léčiv

Do lidského organismu vstupují z vnějšího prostředí různé cizorodé látky, tzv. xenobiotika. Jsou to např. léky, konzervační látky, potravinářská barviva, kontaminanty půdy a vody, složky výfukových plynů a cigaretového kouře atd.^[10] Tyto látky se nejprve dostávají do krevního řečiště přes trávicí ústrojí (žaludek, střeva), respirační systém (plíce, průdušky, nosní sliznice) nebo pokožkou. Cesty vstupu závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech dané látky a na zdroji, ve kterém se vyskytuje.^[11]

Došlo-li ke vstřebání cizorodé látky organismem do krve, následuje druhá fáze transportu, tzv. distribuce toxické látky do orgánů, tkání a cílových buněk. Transport látek do buněk může probíhat volnou difúzí, což je významné u lipofilních látek. Lipofilní látky mají takto usnadněn vstup do organismu, neboť bariéry mezi krví a tkáněmi jsou tvořeny epitelem, jejichž buňky obsahují značné množství lipidů a fosfolipidů. Další způsob vstupu xenobiotik do buněk může být zprostředkovanou difúzí pomocí přenašečů, což se uplatňuje u látek analogických těm, pro které je přenašeč původně určen. Dále se může jednat o aktivní transport, pro který je potřeba energie např. z ATP či endocytosu.^[11] Není-li xenobiotikum v buňce zabudováno, může být vyloučeno močí, stolicí, vydechaným vzduchem, kůží, slinami aj.^[12]

Vstřebávání, distribuce a vylučování xenobiotik jsou projevem organismu na cizorodou látku. U většiny xenobiotik při tom dochází k různým chemickým změnám, nejčastěji pozměnění chemické struktury, což se souborně označuje jako biotransformace.^[12]

Cílem biotransformace je za katalýzy určitými enzymy převést xenobiotika na hydrofilnější produkty, čímž jsou většinou detoxikována a je umožněna jejich eliminace z buňky a exkrece z organismu.^[10] V opačném případě by docházelo k jejich akumulaci v tělních buňkách.^[11] Enzymovými přeměnami mohou však také vzniknout produkty biologicky aktivnější, až toxické.^[10] Jsou však známy metabolity, které se naopak mohou teprve po biotransformaci stát farmakologicky aktivní.^[12]

Hlavním místem biotransformace většiny cizorodých látek jsou játra, dále plíce, střeva a ledviny. Biotransformaci lze u eukaryotických organismů rozdělit do dvou fází, přičemž není nezbytné, aby xenobiotikum prošlo oběma fázemi.^[13]

Reakce první fáze biotransformace vedou ke zvýšení polarity látky zaváděním nebo odkrytím substituentů za účasti enzymů katalyzujících reakce oxidační, redukční a hydrolytické.^[10,13]

Druhá, tzv. konjugační, fáze vede k další polarizaci modifikovaného xenobiotika a usnadnění jeho exkrece z těla. Funkční skupiny vzniklé z metabolismu první fáze reagují s molekulami endogenního původu, např. s aktivovanou kyselinou glukuronovou, glutathionem a acetyl-CoA, za účasti konjugačních enzymů.^[10,13]

V procesu biotransformace se nejvíce uplatňují oxidační reakce, z nichž na prvním místě dominují hydroxylace. Tuto biotransformaci katalyzuje systém enzymů endoplazmatického retikula, který pracuje jako monooxygenasa (oxidasa) se smíšenou funkcí, a jehož nejvýznamnější složkou je cytochrom P450.^[13]

1.2.1 Cytochromy P450

Systém monooxygenas se smíšenou funkcí (MFO systém – „mixed function oxidative system“)

Cytochrom P450 (CYP) je hemoprotein s prosthetickou skupinou protoporfyrinem IX. Pátým ligandem železa je thiolátová síra cysteinu a šesté místo obsazuje navázaný kyslík z molekuly vody.^[10]

Pro enzymovou aktivitu je nutný nejen CYP, ale i další enzym NADPH-cytochrom P450 reduktasa a membrána endoplazmatického retikula. Uvedené tři součásti tvoří mikrosomální monooxygenasový systém. Zatímco první dvě mají enzymovou aktivitu, membrána slouží k udržení jejich nativní konformace a usnadňuje jejich vzájemné interakce.^[10]

NADPH-cytochrom P450 reduktasa je flavoproteinový enzym, který slouží jako akceptor elektronů z NADPH, které pak přenáší na komplex substrát: CYP(Fe^{3+}), kde redukuje centrální atom železa na Fe^{2+} . Obsahuje prosthetické skupiny FAD a FMN. NADPH-cytochrom P450 reduktasa je lokalizována v membráně endoplazmatického retikula a je orientována do cytoplazmatického prostoru.^[10]

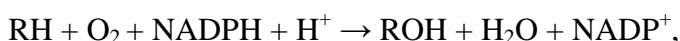
Cytochrom P450

CYP byl objeven v mikrosomální frakci potkaních jater v roce 1958.^[14,15] Jeho funkce byla objasněna v roce 1963. V dnešní době je popsáno více než 1200 různých forem CYP, nacházejících se v nejrůznějších živočišných a rostlinných druzích.^[16] Kromě savců je popisován výskyt v organismech ptáků, ryb, plazů, hmyzu, měkkýšů, plžů, členovců, hub, rostlin a bakterií.^[17]

CYP se vyvinuly z dřívějších forem, které se účastnily metabolismu (biosyntézy a odbourávání) endogenních látek, jako jsou např. steroidní hormony. Evoluce těchto proteinů nastala kvůli stále se zvyšujícímu výskytu cizorodých látek v prostředí, kterým byly a jsou organismy neustále vystavovány. Proto CYP rozšířily svou enzymovou specifitu, aby mohly metabolizovat, a tím usnadnit eliminaci, xenobiotika.^[18]

CYP jsou zodpovědné za většinu přeměn cizorodých látek v organismu. V procesech bioaktivace jsou zahrnuty více než jiné enzymy, pravděpodobně proto, že mají širokou substrátovou specifitu, což jim umožňuje katalyzovat metabolismus velmi odlišných xenobiotik.^[18,19] Participují na I. fázi biotransformace, kde se účastní oxidačních reakcí jak při metabolismu xenobiotik, tak mnoha endogenních látek.^[20]

Enzymové reakce CYP obecně vykazují stechiometrii oxidace se smíšenou funkcí.^[21] V přítomnosti O₂ a NADPH katalyzují inkorporaci jednoho atomu kyslíku do molekuly substrátu, zatímco druhý atom je redukován na vodu.^[18] Obecný průběh monooxygenasové reakce katalyzované cytochromy P450 lze vyjádřit rovnicí:

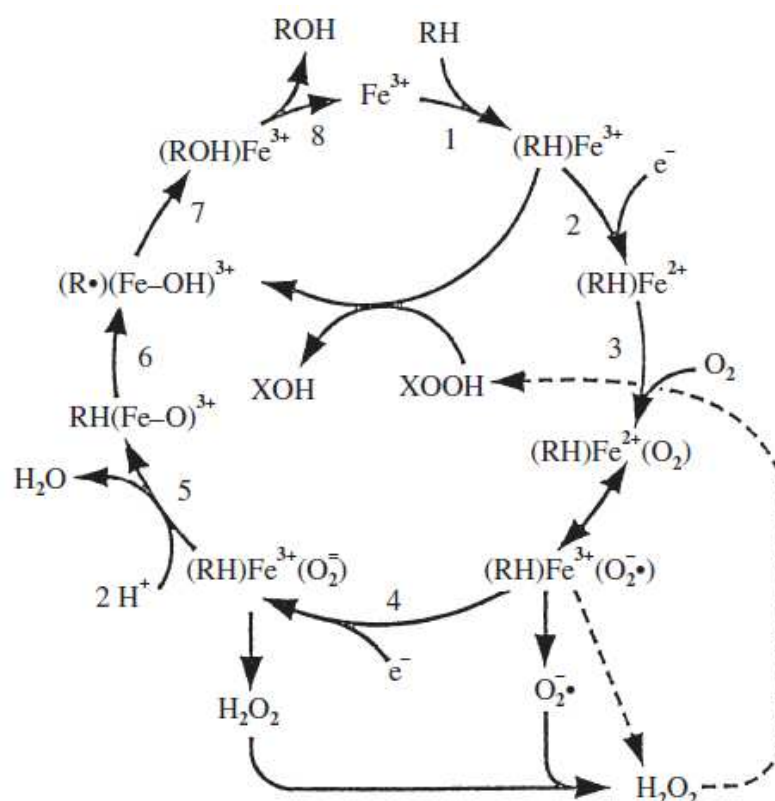


kde RH je substrát a ROH je produkt.^[20]

Reakční mechanismus cytochromu P450

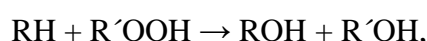
Reakční sled sestává z několika kroků (*Obrázek 1, str. 21*). Nejprve se váže substrát na ferri formu CYP, přičemž se mění konformace molekuly enzymu (Fe v hemu se z formy hexakoordinované dostává do formy pentakoordinované). Poté dochází k přenosu elektronu z NADPH:cytochrom P450 reduktasy, čímž je Fe³⁺ CYP redukováno na Fe²⁺. Na ion železa této formy enzymu se pak váže biatomická molekula kyslíku za tvorby ternárního komplexu CYP-O₂-substrát. Ternární komplex přechází do jiného mezomerního stavu, na ferri-superoxidový komplex, který je dále redukován NADPH:cytochrom P450

reduktasou (popř. NADH:cytochrom b_5 reduktasou), za vzniku ferro-superoxidového komplexu. Po celé této aktivační fázi je biatomická molekula kyslíku štěpena, přičemž jeden atom kyslíku je redukován na vodu a druhý zůstane vázán na iontu Fe v hemu ve formě ferrioxenového komplexu. V dalším kroku dochází k odštěpení vodíkového atomu z molekuly substrátu za vzniku radikálu substrátu a hydroxylového radikálu vázaného na ion železa hemu. Po reakci radikálů se uvolňuje hydroxylovaná molekula substrátu a nativní forma CYP. ^[22]



Obrázek 1: Reakční cyklus CYP (převzato z ^[22])

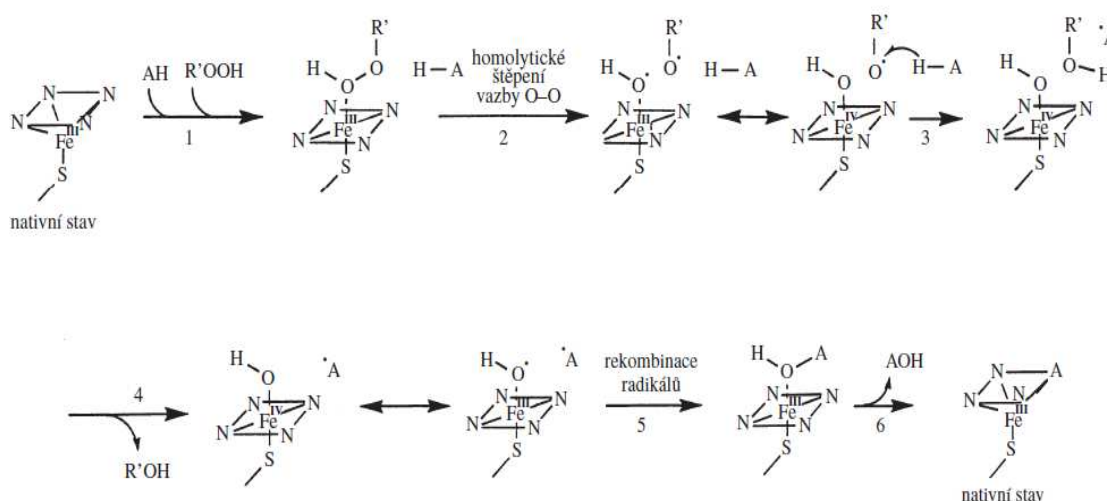
Vedle kyslíku může CYP pro oxidační reakce využívat peroxidy, hydroperoxidy a peroxykyseliny. Ty se stávají donorem atomu kyslíku. Reakci vystihuje sumární rovnice:



kde RH je substrát, $\text{R}'\text{OOH}$ je hydroperoxid, ROH je hydroxylovaný produkt reakce a $\text{R}'\text{OH}$ je alkohol vzniklý redukcí hydroperoxidu. ^[22]

Nejprve se na nativní CYP váže hydroperoxid a oxidovaný substrát. Následně dochází k homolytickému štěpení vazby O-O v hydroperoxidu, za vzniku hydroxylového radikálu

(vázan na Fe hemu) a příslušného alkoxy radikálu. Tento alkoxy radikál odštěpí atom vodíku z molekuly substrátu za vzniku radikálu substrátu. Redukovaný hydroperoxid se uvolní z enzymu. Hydroxylový radikál a radikál substrátu spolu reagují za vzniku hydroxylovaného substrátu, který se uvolní a CYP se vrátí do nativního stavu (Obrázek 2).^[22]



Obrázek 2: Pravděpodobný mechanismus peroxidasové aktivity CYP (převzato z ^[22])

Reakce s organickými hydroperoxidy probíhá, narozdíl od reakce v přítomnosti NADPH a O_2 , neuspořádaným mechanismem, takže vazba peroxidu není závislá na vazbě substrátu. Účinnosti oxidace organických substrátů peroxidasovou aktivitou CYP je obvykle nižší než reakce za přítomnosti NADPH a O_2 , a to především z důvodu významné destrukce enzymu.^[22] Dochází k degradaci hemu na reaktivní fragmenty, které se pak mohou kovalentně vázat do aktivního centra enzymu, a tak jej ireverzibilně inaktivovat.^[23]

Lokalizace cytochromů P450

V savčím organismu jsou všechny CYP vázány v membráně. Většina z nich se nachází v membráně endoplasmatického retikula.^[21] V bakteriích se nacházejí v rozpustné formě v cytosolu.^[16]

CYP se vyskytují v každé tkáni, s výjimkou příčně pruhovaného svalstva a červených krvinek. Především se vyskytují v játrech, která jsou hlavním místem biotransformace xenobiotik.^[18] Dále v ledvinách, prostatě, kůži, nosním epitelu, srdečním svalu, nadledvinách, placentě, mozku, plicích, slezině, slinivce, trávicím traktu (hlavně v tenkém

střevě), vaječnících a varlatech.^[16,20] Jejich množství v jednotlivých tkáních závisí na mnoha faktorech, např. na genetickém polymorfismu, vlivu vnějšího prostředí, výživě, věku, pohlaví, kouření, konzumaci alkoholu a působení podávaných léčivých přípravků. I když je tedy o určité isoformě CYP známo, že je přítomna jen v malém množství, může se její koncentrace v příslušné tkáni či orgánu za určitých podmínek extrémně zvýšit. To tedy znamená, že některé z CYP jsou inducibilní enzymy (viz podkapitola 1.2.1.1).^[16]

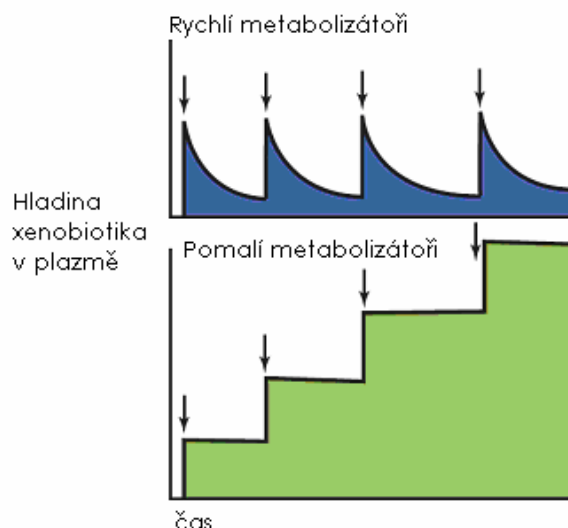
Genetický polymorfismus byl dosud prokázán u isoform CYP1A1, 2A6, 2C19, 2D6, 3A5, 2E1, a je pravděpodobný u isoform CYP1A2 a 2C9.^[24] Vrozené změny DNA vedou k tomu, že určitá isoforma CYP buď úplně chybí nebo není inducibilní či má změněnou katalytickou aktivitu. Polymorfismus je obvykle definován jako geneticky podmíněný rozdíl zasahující alespoň 2% uvažované populace.^[20]

Lidské cytochromy P450

Lidský genom kóduje 57 proteinů CYP, lišících se strukturou i substrátovou specifitou.^[25] Většina z nich je zahrnuta v metabolismu steroidů, žlučových kyselin, mastných kyselin, eikosanoidů a v tukách rozpustných vitamínů. Téměř 15 jich je zahrnuto v metabolismu léčiv a jiných xenobiotických látek. Mnoho z těchto CYP, které metabolizují xenobiotika, také aktivuje kancerogeny.^[21]

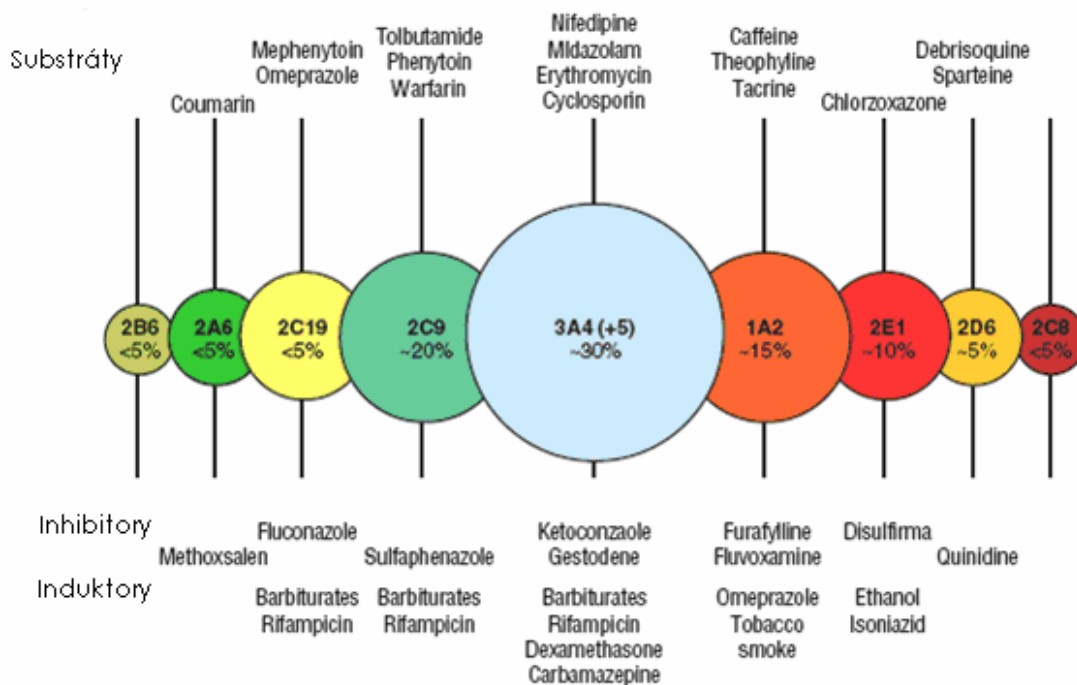
Jedince tzv. kavkazské populace můžeme podle metabolické aktivity rozdělit na pomalé, středně rychlé a rychlé metabolizátory.^[16] Většina populace se vyznačuje rychlým metabolismem, kdy hladina xenobiotika, např. léčiva, v plazmě se pohybuje kolem určitého průměru, zatímco u pomalého metabolismu následné dávky léčiva zvyšují jeho koncentraci v plazmě (*Obrázek 3, str. 24*). Tato skutečnost může být problematická u léčiv, které mají úzkou terapeutickou šíři.^[24]

Všechny popsané CYP tvoří tzv. superrodinu. Všechny CYP jsou rozděleny podle podobnosti aminokyselinové sekvence do rodin (podobnost nejméně 40%), označených arabskými číslicemi (např. CYP1), které jsou postupně dále děleny na podrodiny (podobnost nejméně 55%), označované velkými písmeny (např. CYP1A), které mohou obsahovat jeden nebo více jednotlivých enzymů (isoform), označených arabskou číslicí (např. CYP1A1). Tato kritéria klasifikace jsou tedy striktně strukturální bez ohledu na jejich substrátovou specifitu.^[18,20]



Obrázek 3: Rozdíly v koncentracích léčiv v plazmě u pomalých a rychlých „metabolizátorů“ (převzato z ^[24])

Na biotransformaci přibližně 98% xenobiotik, u kterých je znám biotransformační proces, se podílí především 9 základních forem CYP: CYP3A4, CYP2C9, CYP1A2, CYP2E1, CYP2C19, CYP2D6, CYP2A6, CYP2C8 a CYP2B6 (Obrázek 4).^[21,26]



Obrázek 4: Hlavní jaterní CYP zahrnuté v metabolismu léčiv (převzato z ^[21])

1.2.1.1 Regulace exprese cytochromů P450 indukci

Řada cytochromů P450 patří mezi inducibilní enzymy. Indukce enzymů je definována jako nárůst exprese katalyticky aktivních forem enzymů, kdy dochází ke zvýšení transkripce na základě stimulace chemickým signálem.^[27]

Některá xenobiotika jsou důležitými induktory cytochromů P450.^[28,29] Indukce CYP xenobiotiky je běžný obranný mechanismus buněk, který obvykle vede ke zvýšení detoxikace xenobiotik. V některých případech se však mohou tvořit metabolity toxičtější či kancerogenní.^[30] Naopak v případě léčiv vyžadujících metabolickou aktivaci může indukce cytochromu P450 vést ke zvýšení jejich farmakologického účinku. Jak již bylo uvedeno v kapitole 1.2.1., z hlediska metabolismu xenobiotik jsou nejdůležitější cytochromy P450 rodin 1-4. Jejich geny jsou transkripčně aktivovány cizorodými látkami prostřednictvím mechanismů závislých na receptorech.^[27]

AhR (aryl hydrocarbon receptor) participuje na indukci CYP1.^[29] Jedná se o transkripční faktor, který je členem bHLH třídy DNA-vazebných proteinů. Zároveň je jediným známým zástupcem této třídy, který je aktivován ligandem.^[31] V nepřítomnosti ligandu je Ah receptor lokalizován v cytosolu asociovaný s hsp90.^[32] Navázání agonisty iniciuje sérii událostí vedoucích k disociaci hsp90, jaderné lokalizaci a heterodimerizaci s proteinem Arnt (AhR nuclear translocator).^[33-36] Výsledný komplex je schopen interagovat s DRE elementy, které se nacházejí uvnitř 5' regulačních oblastí responzivních genů, a modulovat rychlost jejich transkripce.^[37]

Indukce CYP2, CYP3 a CYP4 je zprostředkována jadernými receptory **CAR** (constitutive androstane receptor), **PXR** (pregnane X receptor) a **PPAR** (peroxisome proliferator-activated receptor). Tyto transkripční faktory se vážou k cílovým sekvencím na DNA v komplexu s RXR (retinoid X receptor).^[29]

Příklady induktorů CYP uvádí *Tabulka 1*.

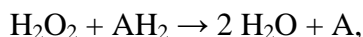
Tabulka 1: Indukce cytochromů P450 prostřednictvím receptorů.^[29]

| Receptor | Indukované CYP450 | Induktory |
|----------|-------------------|---|
| AhR | CYP1 | polycyklické aromatické uhlovodíky |
| CAR | CYP2 | fenobarbital a fenobarbitalu podobné lipofilní sloučeniny |
| PXR | CYP3 | přírodní a syntetické steroidy, např. dexamethazon |
| PPAR | CYP4 | fibráty |

1.2.2 Peroxidasy

Peroxidasy jsou enzymy, které katalyzují oxidoredukční reakce. Redukují molekulu peroxidu vodíku H_2O_2 (nebo jiné peroxidy) za současné oxidace další sloučeniny, ať už endogenní či xenobiotika.^[22] Podílejí se tak na ochraně organismu před toxickým působením H_2O_2 , popř. reaktivních forem kyslíku.^[38]

Reakci lze sumarizovat:



kde AH_2 je redukční substrát a A je oxidovaný produkt.^[38]

Peroxidasy mají širokou substrátovou specifitu, čímž se blíží MFO systému obsahujícímu cytochrom P450 jako terminální oxidasu.^[22] Nejlépe přeměňují fenoly a aromatické aminy.^[39,40] Peroxidasy se vyskytují v rostlinném i živočišném organismu. Příkladem rostlinné peroxidasy je např. křenová peroxidasa. Příklady živočišných peroxidas jsou laktoperoxidasa, thyroidperoxidasa, myeloperoxidasa a cyklooxygenasa, které byly detekovány např. ve žlázách a žlázových sekretech savců.^[38,41]

Typickou vlastností peroxidas je schopnost katalyzovat velké množství různých typů reakcí:^[22]

- klasické peroxidasové redoxní reakce vedoucí k dehydrogenaci
- halogenace a dehalogenace (*halogenperoxidasy*, *thyroidperoxidasa*)
- oxidace halogenidů (*myeloperoxidasa*)
- oxidační kondenzace aromatických aminů
- oxidační polykondenzace fenolu a jeho derivátů za vzniku ligninu
- dekarboxylační reakce, např. dekarboxylace kyseliny indolyloctové
- oxidační štěpení azoskupiny za vzniku diazoniového iontu
- disproportionace peroxidu vodíku (*katalasa*)
- oxygenace
- hydroxylace
- N- a O-demethylace

Peroxidasy jsou většinou hemoglykoproteiny^[42], jejichž prostetickou skupinu tvoří obvykle ferriprotoporfyrin IX. Železo této skupiny je pentakoordinované^[43,44], přičemž pátý ligand tvoří dusík histidylového zbytku proteinové části enzymu. Existují peroxidasy

s pozměněným porfyrinovým skeletem nebo v nich porfyrinový skelet dokonce chybí. Takové peroxidasy obsahují např. ionty manganu (Mn^{2+}) nebo vanadu (V^{5+}).^[42] Právě podle charakteru aktivního místa jsou peroxidasy členěny do tří skupin – hemové peroxidasy, vanadové peroxidasy a ostatní peroxidasy. Nejpočetnější je skupina peroxidas, jejichž katalytické centrum obsahuje hem.^[22]

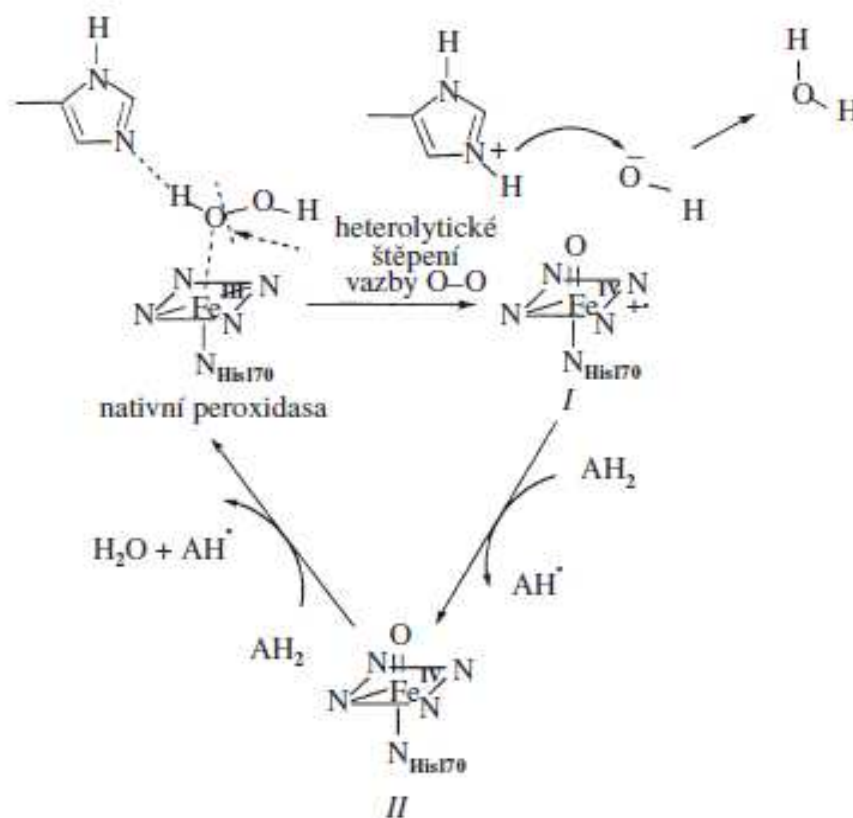
Reakční mechanismus peroxidasy za účasti H_2O_2 (Obrázek 5, str. 28)

Vazbou H_2O_2 nebo jiného peroxidu (ROOH) na nativní peroxidasu (hemové železo je ve ferri formě Fe^{3+}) se tento enzym aktivuje. Vzniká sloučenina I, která je nestabilní a má charakteristickou zelenou barvu.^[22]

V nativní peroxidase je železo pentakoordinované^[43,44], proximálním ligandem je dusík histidylového zbytku proteinové molekuly. Po reakci s H_2O_2 vzniká ferrylnporfyrinový π -kation radikál (sloučenina I), ve kterém je na místě šestého ligandu vázán aktivovaný kyslík. Vzhledem k tomu, že železo v oxidačním čísle V není stálé, vyskytuje se ve sloučenině I v oxidačním čísle IV a chybějící ekvivalent je přítomný na hemu.^[22]

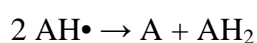
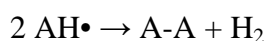
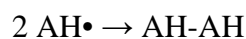
Reakcí sloučeniny I se substrátem (donorem elektronů) vzniká sloučenina II (charakteristická červená barva) a radikál substrátu. Tímto elektronem se doplní deficit na porfyrinovém skeletu.^[22]

Cyklus se uzavírá reakcí sloučeniny II s další molekulou substrátu, přičemž se obnoví peroxidasa v základním, nativním stavu.^[22]



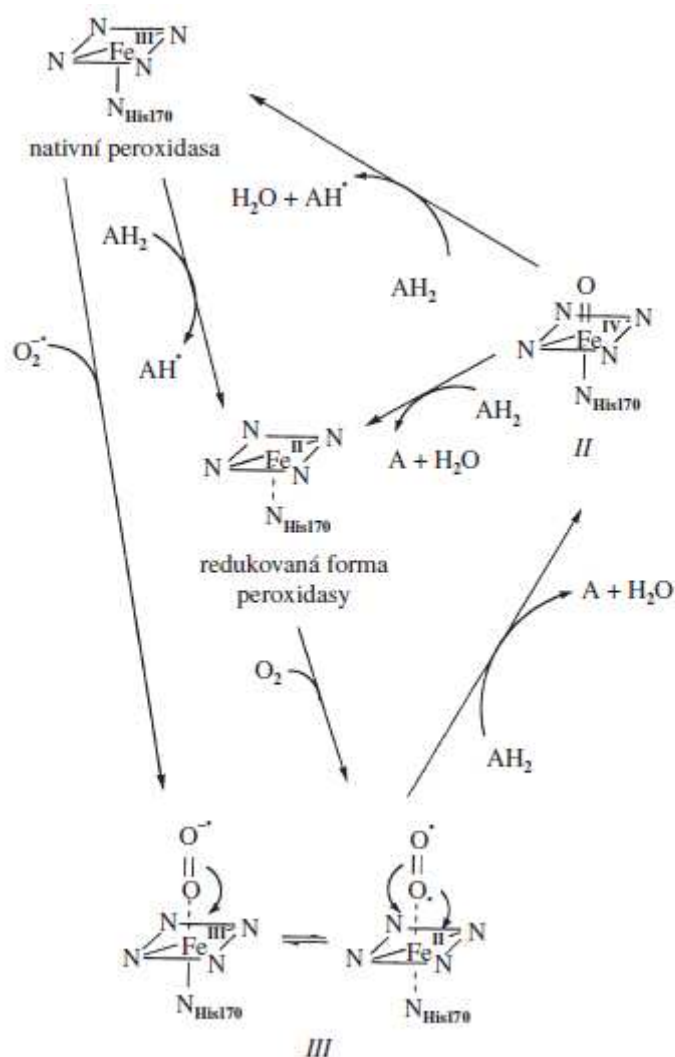
Obrázek 5: Reakční mechanismus peroxidasy za účasti H_2O_2 (převzato z ^[22])

Radikály vzniklé jednoelektronovou oxidací substrátu pak mohou reagovat buď za vzniku polymeračních nebo oxidačních produktů:^[22]



Oxidace substrátu (AH_2) peroxidasami je zprostředkována dvěma jednoelektronovými přenosy. Existují však výjimky. Např. jodidy jsou oxidovány sloučeninou I thyroidperoxidasy reakcí přenášející dva elektrony. Podobně mohou být oxidovány i aromatické sulfidy na sulfoxidy.^[22]

Některé sloučeniny mohou být oxidovány peroxidasami i v nepřítomnosti peroxidu (Obrázek 6, str. 29), např. hydrochinony, naftochinony a kyselina indolyloctová. Předpokládá se participace sloučeniny III (oxyperoxidasa).^[22]



Obrázek 6: Reakce vzniku sloučeniny III za přítomnosti O_2 (převzato z [22])

1.2.2.1 Laktoperoxidasa

Laktoperoxidasa (LPO) je hemová peroxidasa využívající peroxid vodíku k oxidaci velkého množství substrátů. Nachází se v sekretech (mléko, slzy, sliny, hleny) lidí a jiných savců.^[45] Jako jiné hemové peroxidasy i LPO má důležitou funkci v obraně hostitele proti mikrobům.^[46-48]

LPO může oxidovat bromidové a jodidové anionty, ale narozdíl od myeloperoxidasy a chloroperoxidasy nemůže oxidovat chloridové ionty.^[49]

Antimikrobiální aktivita peroxidasových enzymových systémů je založena na oxidační síle jejich reakčních produktů. Např. hlavním cílem LPO/ SCN^- systému (SCN^- je substrát LPO přítomen v mléce) jsou enzymy a proteiny v bakteriální buněčné membráně, které exponují thiolové skupiny ($-SH$), jež jsou dále konvertovány na disulfidy. Buňky pak

akumulují poškození membrán, což vede ke ztrátě pH gradientu, propouštění iontů K^+ a inhibici respirace nebo transportu rozpuštěných látek jako jsou aminokyseliny a glukosa.^[46,50,51]

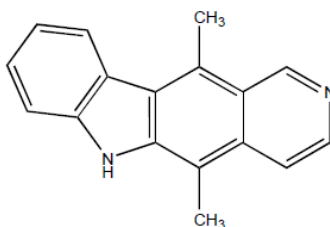
1.2.2.2 Křenová peroxidasa

Křenová peroxidasa je hemový enzym využívající peroxid vodíku k oxidaci široké škály organických a anorganických sloučenin. Je přítomna v kořenech křenu a používá se hojně jako komponenta klinických diagnostických „kitů“ a pro imunostanovení. Kořeny rostliny obsahují několik isoenzymů křenové peroxidasy.^[52]

Křenovým peroxidasám se připisuje několik fyziologických funkcí, např. metabolismus kyseliny indolyloctové, lignifikace, síťování polymerů buněčné stěny, tvorba suberinu a rezistence proti infekcím. Typickými substráty HRP jsou aromatické fenoly, fenolické kyseliny, indoly, aminy a sulfonáty.^[52]

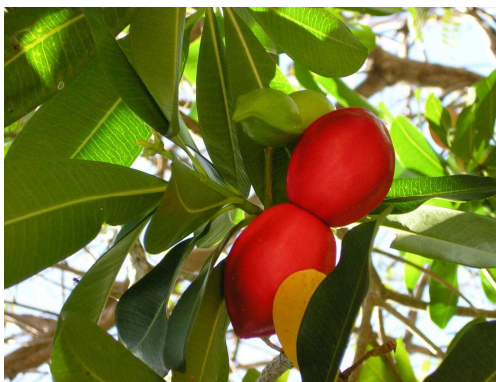
1.3 Ellipticin

Ellipticin (Obrázek 7) je z chemického hlediska pyridokarbazol, jehož systematický název je 5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]karbazol.^[53]



Obrázek 7: Vzorec ellipticinu (převzato z ^[41])

Jedná se o alkaloid izolovaný z rostlin čeledi *Apocyanaceae* (např. *Ochrosia borbonica*, *Excavatia coccinea*).^[53] Poprvé byl ellipticin izolován v roce 1959 z listů stále zeleného stromu *Ochrosia elliptica* (Obrázek 8), který roste divoce v Oceánii.^[54]



Obrázek 8: *Ochrosia elliptica* (převzato z ^[55])

Ellipticin a jeho deriváty (9-hydroxyellipticin, 9-hydroxy-*N*²-methylellipticinium, 9-chloro-*N*²-methylellipticinium a 9-methoxy-*N*²-methylellipticinium) jsou protinádorová agens účinná zejména při pokročilém karcinomu prsu s kostními metastázemi, akutní myeloblastické leukémii, sarkomech ledvin, karcinomech štítné žlázy a nádorech mozku.^[53,56] Hlavním důvodem pro zájem o ellipticin a jeho deriváty pro klinické účely je jejich vysoká účinnost proti několika typům rakoviny a jejich relativně nízké vedlejší účinky.^[57] Nicméně bylo zjištěno, že ellipticin a jeho 9-hydroxyderivát jsou silnými mutageny.^[58]

Účelem přípravy derivátů elliptycinu je zvýšení jeho protinádorového účinku, modulace hydrofobicity molekuly ve smyslu zvýšení rozpustnosti, ale i účinnější absorpce léčiva nádorovými buňkami a zvýšení selektivity léčiva pro nádorové buňky, tedy příprava cíleně směřovaného protinádorového léčiva na bázi elliptycinu. Významným místem pro derivatizaci elliptycinového skeletu je atom uhlíku v poloze 9 (9-hydroxyellipticin, 9-methoxyellipticin, 9-chloroellipticin). Další místo důležité pro derivatizaci molekuly elliptycinu je atom dusíku v poloze 2 (9-hydroxy-2-methylellipticininium-acetát, 9-methoxy-2-methylellipticininium-acetát, 9-chlor-2-methylellipticininium-acetát).^[56]

Ellipticiny jsou cytostatika, jejichž přesný mechanismus působení nebyl dosud zcela vysvětlen. Bylo zjištěno, že mohou působit několika mechanismy:^[53]

- Interkalace do DNA
- Inhibice aktivity DNA topoisomerasy II
- Selektivní inhibice fosforylace produktu tumorového supresorového genu, proteinu p53
- Inhibice mitochondriální oxidační fosforylace
- Inhibice telomerasy

Interkalace do DNA – interkalace elliptycinu a jeho metabolitů (derivátů) do dvoušroubovicové struktury DNA vyplývá z velikosti a tvaru jejich molekul a je způsobena slabými reverzibilními hydrofobními interakcemi mezi spárovanými bázemi molekuly DNA.^[57] K interakci dochází mezi methylovými skupinami léčiva a thyminovými bázemi DNA.^[59]

Inhibice topoisomerasy II – ellipticin interaguje buď s molekulou DNA nebo s proteinem topoisomerasy II za tvorby ternárního komplexu, který je katalyticky inaktivní a stimuluje tvorbu řetězových zlomů v DNA.^[60]

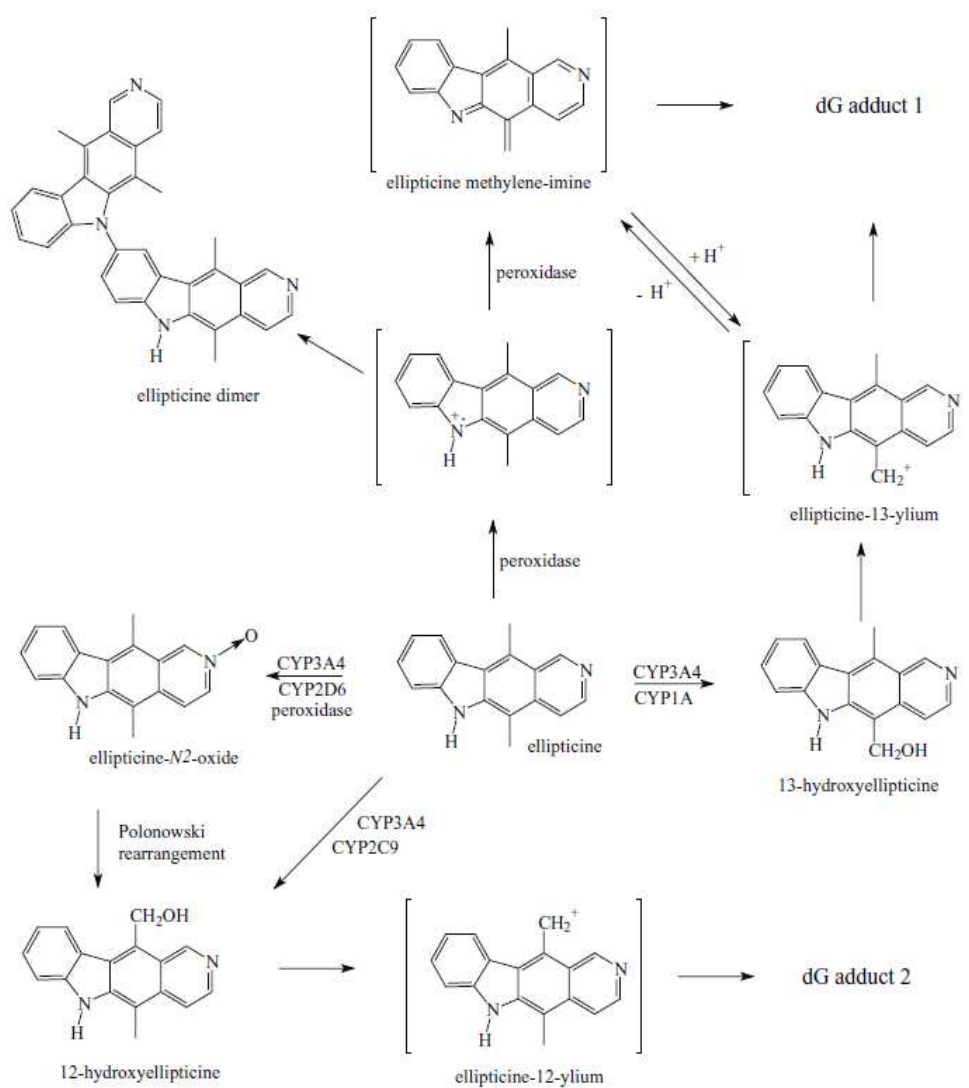
Inhibice fosforylace proteinu p53 – je pravděpodobně způsobena inhibicí specifické cyklin-dependentní kinasy. Akumulace defosforylovaného proteinu p53 může indukovat apoptózu.^[61]

Inhibice oxidační fosforylace – vede k drastickému snížení obsahu ATP v buňkách, což rezultuje v jejich zánik.^[62]

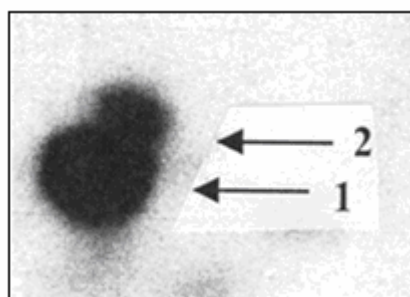
Uvedené protinádorové aktivity léčiva jsou založeny na nespecifickém působení léčiva. (Nespecifický transport vysoce hydrofóbní ellipticinové molekuly přes buněčné membrány do buněk zdravých i nádorových). Nicméně ellipticiny vykazují specifickou protinádorovou aktivitu vůči několika typům rakoviny. Ta by mohla být důsledkem jiného mechanismu působení.^[53,56]

V naší laboratoři bylo zjištěno, že ellipticin se kovalentně váže na DNA *in vitro* a *in vivo* po jeho enzymové aktivaci cytochromy P450 nebo peroxidasami.^[63-72] Oxidací ellipticinu cytochromy P450 vzniká 5 metabolitů: 9-hydroxyellipticin, 7-hydroxyellipticin, 12-hydroxyellipticin, 13-hydroxyellipticin a N^2 -oxid ellipticinu.^[68,72] Oxidací ellipticinu peroxidasami vznikají 2 metabolity: majoritní dimer ellipticinu a minoritní N^2 -oxid ellipticinu.^[53]

9-hydroxyellipticin, 7-hydroxyellipticin a dimer ellipticinu jsou metabolity detoxikační.^[57] 12-hydroxyellipticin, 13-hydroxyellipticin a N^2 -oxid ellipticinu jsou metabolity odpovědné za tvorbu dvou aduktů ellipticinu s DNA *in vitro* a *in vivo* v játrech, ledvinách, plicích, slezině, srdci a mozku potkanů vystavených působení ellipticinu.^[53,66] Cílovou bází pro jejich vazbu na DNA je deoxyguanosin.^[68] 13-hydroxyellipticin se spontánně rozkládá na reaktivní karbeniový ion, který reaguje s jedním z nukleofilních center v molekule guaninu DNA (např. exocyklická $-NH_2$ skupina guaninu) za tvorby majoritního aduktu v DNA (adukt 1). Stejným principem se tvoří minoritní adukt (adukt 2) z 12-hydroxyellipticinu.^[53,68] (Obrázek 9, Obrázek 10, str. 34)



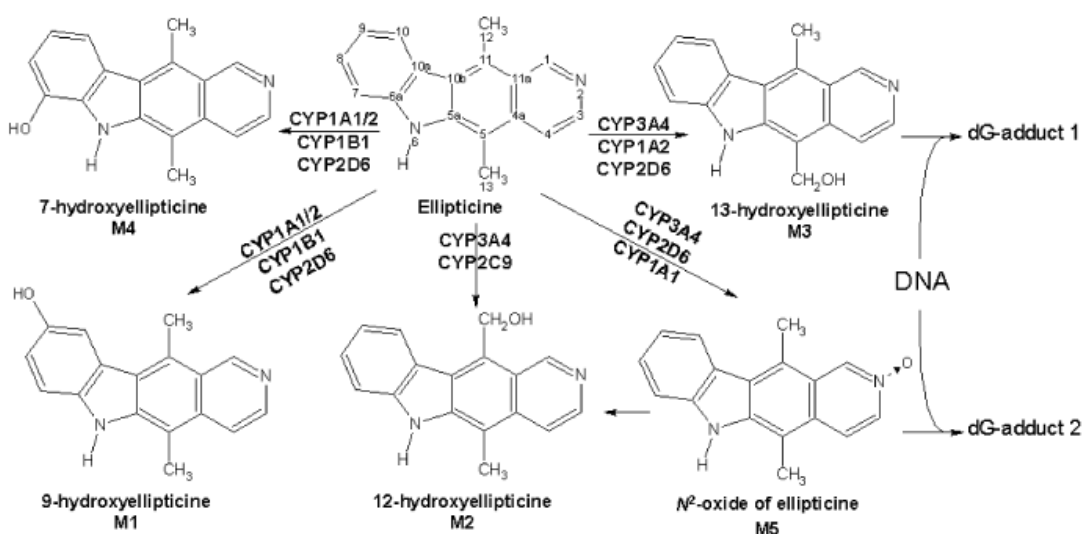
Obrázek 9: Schéma metabolické aktivace ellipticinu působením CYP a peroxidas znázorňující metabolity, které tvoří adukty s DNA (převzato z [71])



Obrázek 10: Autoradiografický profil aduktů ellipticinu aktivovaného lidským CYP3A4 s DNA. Adukty byly analyzovány metodou ^{32}P -postlabeling (převzato z [65])

Z lidských cytochromů P450 se na tvorbě 9-hydroxyellipticinu a 7-hydroxyellipticinu podílí převážně CYP1A1 a CYP1A2^[53,68,72], v menší míře pak CYP1B1 a CYP2D6.^[53] Na tvorbě 13-hydroxyellipticinu participuje CYP3A4^[53,68,72], následovaný CYP1A2, CYP2D6 a CYP2C9.^[53] 12-hydroxyellipticin je tvořen CYP3A4 a CYP2C9.^[53] Na tvorbě *N*²-oxidu ellipticinu se podílí CYP3A4^[53,68,72] a CYP2D6.^[53,68] (Obrázek 11)

V lidských játrech je nejvíce zastoupený CYP3A4 (~30%)^[73], tudíž hlavními metabolity ellipticinu tvořenými lidskými jaterními mikrosomy je 13-hydroxyellipticin a *N*²-oxid ellipticinu.^[68]



Obrázek 11: Schéma metabolismu ellipticinu lidskými CYP (převzato z ^[68])

Z potkaních cytochromů P450 se na tvorbě 9-hydroxyellipticinu a 7-hydroxyellipticinu podílí převážně CYP1A1 a CYP1A2^[53,56], zatímco 13-hydroxyellipticin a *N*²-oxid ellipticinu jsou tvořeny za účasti CYP3A1.^[53]

Za oxidaci ellipticinu potkaními jaterními mikrosomy jsou odpovědné CYP enzymy analogické CYP enzymům odpovědným za oxidaci ellipticinu lidskými jaterními mikrosomy. Proto byli potkani použiti jako modelový organismus pro studium osudu ellipticinu *in vivo*.^[53]

Peroxidasy jako je hovězí laktoperoxidasa (LPO), lidská myeloperoxidasa (MPO), ovčí cyklooxygenasa-1 (COX-1), lidská cyklooxygenasa-2 (COX-2) a rostlinná křenová peroxidasa (HRP) také oxidují ellipticin na formy vázající se k DNA *in vitro* (Obrázek 9, str. 34).^[53]

Peroxidasy metabolizují ellipticin jednoelektronovou oxidací na volné radikály, které v závislosti na prostředí tvoří buď další metabolity jako je dimer ellipticinu nebo adukty s DNA. Za fyziologických podmínek je preferována tvorba aduktů ellipticinu s DNA (v tomto případě DNA adukt 1), kdy molekula DNA váže reaktivní meziprodukt ellipticinu.^[53,71] Dvouelektronovou oxidací ellipticinu se tvoří methylen-imin ellipticinu^[53] (*Obrázek 9, str. 34*).

Peroxidas se podílí také na tvorbě DNA aduktu 2, kdy minoritní metabolit oxidace ellipticinu peroxidasami, N^2 -oxid ellipticinu, spontánně přechází na 12-hydroxyellipticin (tzv. Polonowského přesmyk^[74]), který je odpovědný za tvorbu tohoto aduktu^[53,68] (*Obrázek 9, str.34*).

Dále bylo zjištěno, že ellipticin působí nejen jako substrát CYP, ale také jako induktor některých CYP (CYP1A1, CYP1B1).^[56] K indukci exprese uvedených CYP dochází vazbou ellipticinu na Ah receptor (viz. podkapitola 1.2.1.1).^[75]

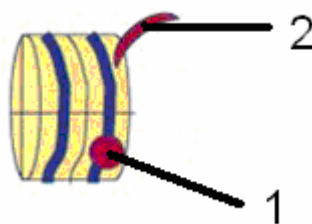
V současné době není možné jednoznačně říci, zdali jsou protinádorové, cytostatické a genotoxické aktivity ellipticinu spojeny s jedním nebo několika efekty poškozujícími DNA.^[53]

Při terapii ellipticiny byla pozorována interindividuální variabilita v odpovědích pacientů na podané léčivo. Specifické působení ellipticinu pravděpodobně vychází z rozdílné enzymové výbavy lidského organismu. Za přítomnosti enzymů, které jsou důležité pro biotransformaci ellipticinu (viz výše uvedené údaje) dochází k aktivaci léčiva na terapeuticky účinnější deriváty, které pak buňky novotvaru poškozují efektivněji.^[56]

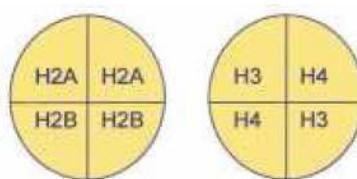
1.4 Inhibitory histondeacetylas

Eukaryotická DNA je uskladněna v jádře tak, že je „navinuta“ na histonové proteiny a spolu s nimi tvoří nukleosomy, které se dále spojují do kondenzované struktury chromatinu.^[76]

Nejzákladnější element „sbalení“ DNA je nukleosom (*Obrázek 12*), který se skládá ze dvou smyček DNA ovinutých kolem oktameru čtyř jaderných histonových proteinů (H2A, H2B, H3 a H4) (*Obrázek 13*). Jeden nukleosom je tvořen 200 páry bází DNA, přičemž 146 párů bází je pevně vinuto okolo histonových oktamerů a zbývajících 54 párů leží mezi dvěma nukleosomy. Nukleosomy mohou interagovat samy navzájem za tvorby spirály, která se označuje jako solenoid, který obsahuje 6 nukleosomů na otočku a v některých eukaryotických buňkách vyžaduje jednu kopii histonového H1 proteinu k interakci s každým nukleosomem.^[77]



Obrázek 12: Schématické znázornění nukleosomu (modrá – vlákno DNA, žlutá – histony, červená – 1. histonový konec, který může být modifikován, 2. histonový konec modifikovaný acetylovou skupinou) (převzato z ^[78])

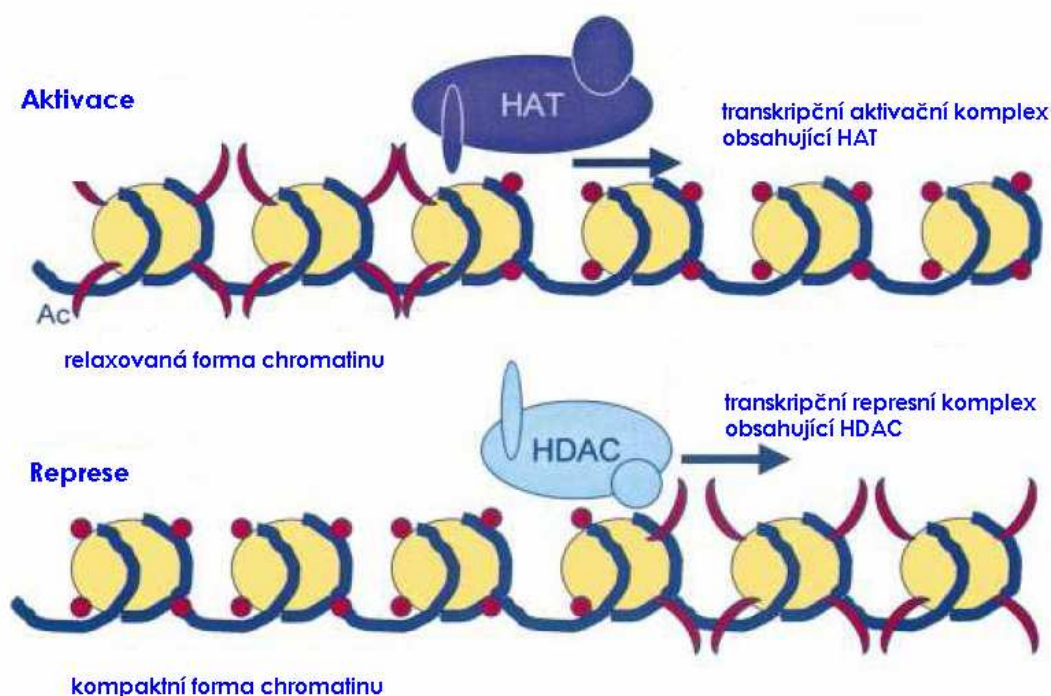


Obrázek 13: Schématické znázornění nukleosomu jako oktameru čtyř jaderných histonových proteinů (vlevo pohled ze shora, vpravo pohled zespoda) (převzato z ^[78])

Expresí těchto „sbalených“ genů je regulována posttranslační modifikací histonů, která přestavuje oblasti chromozomů do transkripčně aktivního nebo inaktivního chromatinu.^[77] Nejlépe prostudovaná posttranslační modifikace histonů je acetylace $\varepsilon\text{-NH}_2$ skupin evolučně konzervovaných lysylových zbytků umístěných na N-konci v histonových doménách.^[77,78]

Pravděpodobný mechanismus, kterým histonová acetylace může ovlivňovat chromatinovou strukturu, spočívá v tom, že kladně nabitě lysylové zbytky vyčnívají vně nukleosomu^[79], interagují s negativními náboji DNA dalšího nukleosomu, a tak stabilizují stočenou strukturu a kompaktní formu chromatinu. Acetylace histonů redukuje tento náboj, dochází k destabilizaci a uvolnění pevně stočeného chromatinového vlákna, nukleosomy disociují a DNA se stává přístupnější pro transkripční faktory a RNA polymerasu.^[76,77]

Na těchto přestavbách se podílí dva typy navzájem antagonistických enzymů. Histonacetyltransferasy (HAT) přidávají acetylové skupiny z acetylkoenzymu A, histondeacetylasy (HDAC) odstraňují acetylové skupiny, tj. deacetylují. Často jsou tyto enzymy spojeny nebo jsou součástí transkripčního faktoru, který se váže k DNA.^[76] HAT aktivitu mají „koaktivační“ komplexy, které stimulují transkripci, HDAC aktivitu mají „korepresorové“ komplexy, které se podílí na transkripční represi^[77,80-82] (Obrázek 14). A právě se špatnou funkcí „koaktivátoru“ nebo „korepresoru“ je spojováno několik druhů rakoviny u člověka.^[77]



Obrázek 14: Transkripční aktivace a represe (převzato z ^[78])

V savčích buňkách bylo popsáno několik histondeacetylas, které jsou klasifikovány do tříd podle jejich primární homologie s histondeacetylasy *S.cerevisiae*.^[83]

- třída I – HDAC 1, HDAC 2, HDAC 3, HDAC 8^[84]
- třída II – HDAC 4, HDAC 5, HDAC 6, HDAC 7, HDAC 9, HDAC 10^[84]
- třída III – SIRT 1 – 7^[85]
- třída IV – HDAC 11^[86]

Histondeacetylasy třídy I jsou podobné kvasničné histondeacetylase RPD3.^[83,84] S výjimkou HDAC 8 jsou lokalizovány v jádře, kde fungují jako katalytické podjednotky velkých multiproteinových komplexů zprostředkovávajících transkripční represi.^[87]

Histondeacetylasy třídy II jsou podobné kvasničné histondeacetylase HDA1.^[83,84] HDAC 4, 5, 7 a 9 jsou transportovány z jádra do cytoplazmy a zpět a asociují se k HDAC 3 v multienzymových komplexech nesoucích deacetylaseovou aktivitu. HDAC 6 a 10 se nacházejí v cytosolu.^[87]

Histondeacetylasy třídy III jsou podobné kvasničné histondeacetylase SIR 2.^[83] Jejich funkce je závislá na přítomnosti NAD⁺ a zaměřena hlavně na nehistonové proteiny.^[85]

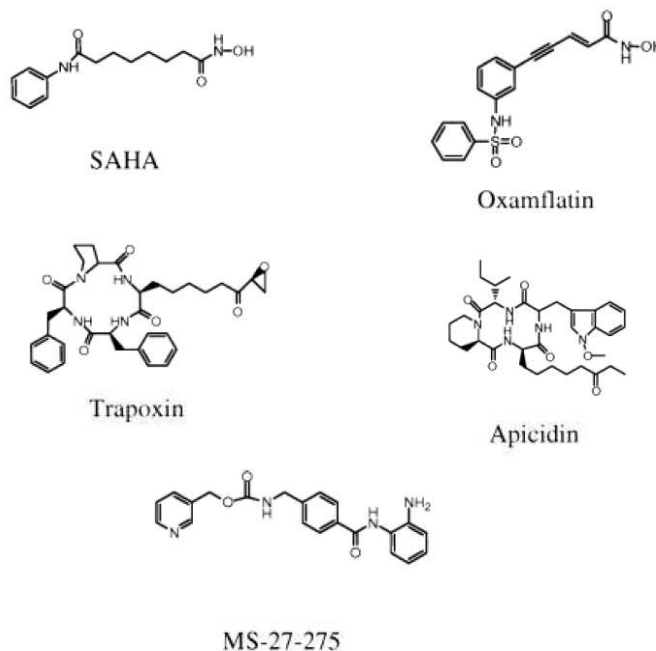
Funkce jediné histondeacetylasy třídy IV, HDAC 11, je zatím neznámá. Řadí se do samostatné třídy, protože její homologie s histondeacetylasy třídy I a II je příliš nízká.^[86]

Jako model pro určení struktury katalytického jádra histondeacetylas rentgenovou krystalografií byl použit homolog lidské HDAC z hypertermofilní bakterie *Aquifex aeolicus* (označený jako „HDLP“). HDLP sdílí 35,2% sekvenční identity s lidskou HDAC 1, deacetyluje histony *in vitro* a je inhibována trichostatinem A (TSA) a kyselinou suberoylanilidhydroxamovou (SAHA).^[88,89] Na základě těchto studií bylo zjištěno, že aktivní místo HDAC je tvořeno úsekem 390 aminokyselin (převážně hydrofóbní a aromatické aminokyseliny - Pro, Gly, Phe, Leu, Tyr^[89]) a je konzervováno u všech histondeacetylas.^[88,89] Má tvar hluboké tubulární „kapsy“, na jejímž dně se nachází Zn-vazebné místo (HDAC vyžaduje pro svou aktivitu kofaktor^[89]) a dva Asp-His „charge-relay“ systémy (tj. systémy přenášející náboj, čímž zajišťují polarizaci imidazolového dusíku a zvyšování jeho bazicity).^[88,89] Vstoupí-li acetylovaný lysin do této „kapsy“, jeho acetylová skupina se „odstřihne“.^[76] U histondeacetylas třídy II je struktura analogická, výjimku tvoří jeden asparagin místo kyseliny asparagové.^[89]

V řadě studií bylo zjištěno, že inhibitory histondeacetylas jsou efektivní chemoterapeutická činidla. Mohou efektivně zastavit transformaci buněk a navrátit je do původního stavu^[90-96] a dále mohou blokovat tvorbu nádorů v modelech hlodavců.^[97,98] Při inhibici histondeacetylas jsou histony acetylovány, DNA relaxuje a je exprimována specifická sada genů.^[88] Inhibitory HDAC jsou selektivní, indukují expresi asi 2% genů^[99], především genů regulujících buněčný cyklus, např. je indukován inhibitor cyklin-dependentní kinasy p21.^[88] Tyto děje vedou k zastavení buněčného růstu, indukci diferenciaci a apoptotické buněčné smrti, tzn. růst nádoru je inhibován.^[76,78,88] Bylo zjištěno, že ve zvířecích modelech inhibitory HDAC inhibují růst nádorů prsu, prostaty, plic, žaludku, dále také neuroblastomu a leukémie.^[100,101]

Vzhledem k významu regulace aktivity HDAC bylo vyvinuto několik typů inhibitorů HDAC (*Obrázek 15*):^[83,88]

- krátkořetězcové mastné kyseliny – butyráty (butyrát sodný, fenylbutyrát), kyselina valproová
- hydroxamové kyseliny – trichostatin A (TSA), kyselina suberoylanilidhydroxamová (SAHA), oxamflatin
- cyklické tetrapeptidy – trapoxin, apicidin
- benzamidy – MS-27-275



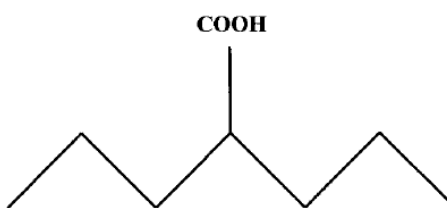
Obrázek 15: Příklady struktur inhibitorů histondeacetylas (převzato z ^[88])

Většina těchto inhibitorů inhibuje třídu I a II histondeacetylas stejně, s výjimkou kyseliny valproové, která je pro třídu II histondeacetylas 5x méně selektivní než pro třídu I.^[78,83]

Většina inhibitorů HDAC inhibuje histondeacetylasy reverzibilně, s výjimkou např. trapoxinu, který inhibuje enzym ireverzibilně, kovalentní vazbou k epoxyketonové skupině.^[78,92]

1.4.1 Valproát

Kyselina valproová byla syntetizována v roce 1882 jako organické rozpouštědlo.^[102] V roce 1963 Eymard objevil její antiepileptický účinek.^[103] Od té doby je úspěšně používána pro léčbu epilepsie, a také jako neuropsychiatrické léčivo při léčbě pacientů s bipolární afektivní poruchou.^[104] Během posledních let vyšlo najevo, že kyselina valproová vykazuje také protinádorovou aktivitu.^[105]



Obrázek 16: Chemická struktura VPA (převzato z ^[105])

VPA je malá větvená mastná kyselina^[102] (kyselina 2-propylpentanová, $C_8H_{16}O_2$ ^[106], *Obrázek 16*). Její chemické vlastnosti umožňují její snadné dopravení do organismu a buněk. Je málo rozpustná ve vodě a vysoce rozpustná v organických rozpouštědlech. Ve vodných rozpouštědlech obsahujících alkalické kovy existuje v disociované formě, proto může být snadno dopravena do organismu ve formě sodné nebo hořečnaté soli, které jsou rozpustné ve vodě.^[102]

VPA nejen potlačuje růst nádoru a tvorbu metastáz, ale indukuje také diferenciaci nádoru, apoptózu a inhibuje angiogenezi. Tyto protinádorové účinky vykazuje VPA v různých systémech *in vitro* a *in vivo*: gliom, neuroblastom, nádory prsu, tlustého střeva, prostaty, štítné žlázy, jater, děložního hrdla, děložní sliznice, kůže, vaječníků, močového měchýře atd.^[102]

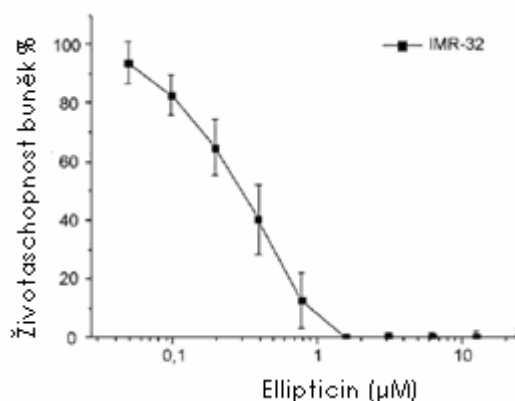
Přesný protinádorový mechanismus VPA není dosud znám. VPA např. inhibuje proteinkinasu C, aktivuje Wnt-signalizaci, proteasomálně degraduje HDAC. Zdá se však,

že jedním z nejdůležitějších protinádorových účinků VPA by mohla být hyperacetylace histonů, jako výsledek inhibice histondeacetylas. Preklinická data naznačují, že protinádorový efekt chemoterapie je zvětšený, když je VPA použita v kombinaci s cytostatiky. VPA zvyšuje cytotoxicitu inhibitorů topoisomerasy II, mezi něž patří i protinádorové léčivo ellipticin. V současné době jsou prováděny klinické zkoušky s VPA u pacientů se zhoubnými nádory.^[107]

1.5 Neuroblastomy a jejich ovlivnění ellipticinem a VPA

Neuroblastom je nádor pocházející z tkáně sympatického nervového systému. Tvoří 8-10% všech dětských nádorových onemocnění a v průběhu prvního roku života je nejčastějším solidním nádorem. Většina neuroblastomů je diagnostikována do 4 let života. Nejčastěji se objevuje v nadledvinách. Metastázuje do kostí, jater, kostní dřeně a lymfatických uzlin.^[108] Pro léčbu neuroblastomů je používáno několik účinných léků (doxorubicin, vincristin, cisplatina), ale u většiny pacientů se poměrně brzy rozvíjí léková rezistence a léčba je dále neúčinná.^[109] Proto je zapotřebí hledat další možnosti účinné chemoterapie.

Při studiu neuroblastomových buněčných linií (IMR-32, UKF-NB-3, UKF-NB-4) bylo zjištěno, že ellipticin inhibuje jejich růst a indukuje apoptózu. Inhibice růstu neuroblastomových buněčných linií je závislá na koncentraci ellipticinu (*Obrázek 17*).^[110]



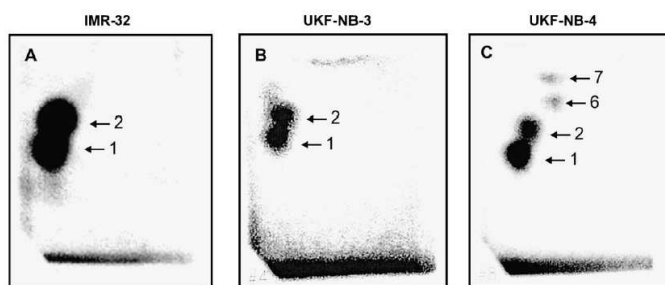
Obrázek 17: Cytotoxicita ellipticinu vůči neuroblastomové buněčné linii IMR-32 (převzato z ^[110])

Porovnáním ellipticinu s doxorubicinem, což je jedno z léčiv používaných k léčbě neuroblastomu v současné době^[109], vyplynulo, že cytotoxicita těchto dvou léčiv vůči neuroblastomovým buněčným liniím UKF-NB-3 a UKF-NB-4 je srovnatelná, jen v případě neuroblastomových buněčných linií IMR-32 je citlivost vůči doxorubicinu asi 20 krát vyšší než k ellipticinu.^[110]

Po určité době léčby neuroblastomů doxorubicinem však neuroblastom získává rezistenci vůči tomuto léčivu.^[109] Rezistence je částečně indukována také po určité době působení ellipticinu, ale v mnohem menším rozsahu než v případě doxorubicinu.^[110]

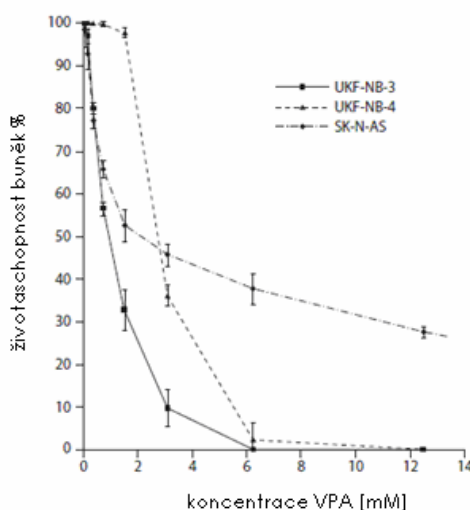
Jedním z mechanismů účinků ellipticinu na neuroblastomové buněčné linie je tvorba kovalentních aduktů s DNA. Bylo zjištěno, že působením ellipticinu na neuroblastomové

buněčné linie IMR-32, UKF-NB-3 a UKF-NB-4 se tvoří dva majoritní adukty ellipticinu s DNA, obdobné těm, které jsou tvořeny 13-hydroxyellipticinem a 12-hydroxyellipticinem *in vitro* a *in vivo*^[53,66] (Obrázek 9, Obrázek 10, str. 34). V případě neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4 se navíc tvoří dva minoritní adukty ellipticinu s DNA (Obrázek 18). Tvorba těchto aduktů je zprostředkována oxidací ellipticinu cytochromy P450 a peroxidasami.^[110]



Obrázek 18: Tvorba ellipticin-DNA aduktů v neuroblastomových buněčných liniích IMR-32, UKF-NB-3 a UKF-NB-4 (převzato z ^[110])

V několika dalších studiích bylo zjištěno, že také inhibitory histondeacetylas (VPA, TSA) působí cytotoxicky vůči některým neuroblastomovým buněčným liniím.^[111-114] Při studiu vlivu VPA a TSA na růst neuroblastomových buněčných linií (UKF-NB-3, UKF-NB-4 a SK-N-AS) bylo zjištěno, že jejich růst je těmito inhibitory histondeacetylas inhibován (Obrázek 19).^[115]



Obrázek 19: Cytotoxicita VPA vůči neuroblastomovým buněčným liniím UKF-NB-3, UKF-NB-4 a SK-N-AS (převzato z ^[115])

2 CÍL PRÁCE

Cílem předkládané diplomové práce bylo rozšíření současných znalostí mechanismu působení protinádorového léčiva ellipticinu, konkrétně možné ovlivnění metabolismu tohoto protinádorového agens inhibitorem histondeacetylas valproátem. Konkrétní cíle byly následující:

- Poznání vlivu inhibitoru histondeacetylas valproátu na oxidaci ellipticinu cytochromy P450 jaterních mikrosomálních systémů laboratorního potkana.
- Poznání vlivu inhibitoru histondeacetylas valproátu na oxidaci ellipticinu peroxidasami.
- Poznání vlivu inhibitoru histondeacetylas valproátu na aktivity isoformů cytochromů P450 podrodin 1A a 3A, tedy enzymů, které participují na oxidaci ellipticinu na metabolity detoxikační (CYP1A) a aktivační (CYP3A).
- Poznání vlivu inhibitoru histondeacetylas valproátu na expresi enzymů oxidujících ellipticin (cytochromy P450 1A1, 3A4 a laktoperoxidasa) v lidských neuroblastomových buněčných liniích.

Diplomová práce byla vypracována jako součást řešení grantových projektů GAČR (P303/10/0356) a MŠMTČR (MSM0021620808 a 1M0505).

3 MATERIÁL A METODY

3.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

■ **AbCam (USA)**

králičí „primární protilátka“ proti laktoperoxidase

■ **AbD Serotec (Velká Británie)**

králičí „primární protilátka“ proti CYP3A4

■ **Bio-Rad (USA)**

„sekundární protilátka“ (koží IgG proti králičí IgY s konjugovanou křenovou peroxidasou), Immun-Star HRP Substrate

■ **British Drug Houses (Velká Británie)**

Sudan I

■ **Calbiochem (USA)**

9-hydroxyellipticin

■ **Fluka (Švýcarsko)**

dichlormethan, akrylamid, dodecylsulfát sodný (SDS), glycin, 2-merkapt ethanol, *N,N'*-methylen-bis-akrylamid (BIS)

■ **Chemické závody Sokolov (ČR)**

peroxid vodíku

■ **KlinLab (ČR)**

Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM)

■ **Lachema (ČR)**

chlorid hořečnatý, octan amonný, uhličitan sodný, hydrogenuhličitan amonný, bromfenolová modř, dihydrogenfosforečnan sodný, hydrogenfosforečnan sodný, kyselina chlorovodíková, persíran amonný

■ **Lach-Ner (ČR)**

methanol, kyselina octová, dihydrogenfosforečnan draselný, hydroxid draselný, chlorid sodný

■ **Loba Feinchemie (Rakousko)**

tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)

■ Merck (Německo)

acetonitril

■ Millipore (USA)

králičí „primární protilátka“ proti CYP1A1

■ Penta (ČR)

ethylester kyseliny octové, glycerol

■ Roche (Švýcarsko)

Complete

■ Serva (Německo)

N,N,N',N'-tetramethyl-ethylendiamin (TEMED), Triton X-100

■ Sigma Aldrich (USA)

dimethylsulfoxid (DMSO), ellipticin, nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADP^+), glukosa-6-fosfát, glukosa-6-fosfátdehydrogenasa, fenacetin, laktoperoxidasa (LPO), křenová peroxidasa (HRP), kyselina 1-heptansulfonová, testosteron, methoxyresorufin, resorufin, 6- β -hydroxytestosteron, tetrasodná sůl redukováného β -nikotinamidadenindinukleotidfosfátu (NADPH), deoxycholát sodný, NP-40, sodná sůl kyseliny valproové (VPA)

Všechny chemikálie byly čistoty p. a. nebo vyšší.

- 13-hydroxyellipticin, N^2 -oxid ellipticinu – syntetizovány na pracovišti katedry biochemie, PřF UK
- jaterní mikrosomální systémy laboratorních potkanů kmene Wistar (kontrolních (nepremedikovaných) potkanů, potkanů premedikovaných Sudanem I a potkanů premedikovaných pregnenolon-16 α -karbonitrilem) – izolovány v laboratoři na katedře biochemie PřF UK. Zvířata byla získána komerčně z laboratoří 1.LF UK, kde probíhaly veškeré experimenty.
- neuroblastomové buněčné linie (UKF-NB-3, UKF-NB-4) – darovány Prof. Jindřichem Činátlem, Jr. z Univerzity J. W. Goethe ve Frankfurtu (Německo) a pěstovány RNDr. Jitkou Poljakovou, Ph.D. na Klinice dětské hematologie a onkologie 2. LF UK v Praze Motole

3.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE

■ *Centrifugy:*

Microcentaur MSE, Sanyo (úhlový rotor)

Centrifuga T 52,2 (výkyvný rotor)

■ *Váhy:*

PESA 40SM-200A (analytické váhy)

KERN EW600-2M (předvážky)

■ *Systém HPLC:*

pumpa: Dionex pump P580

ASI-100 Automated Sample Injector

UV/VIS Detector UVD 170S/340S

termobox pro kolonu: COLUMN OVEN LCO 101

Degasys DG-1210 Dionex

kolony: Ultrasphere, ODS, C18, 250 x 4,6 mm, 5 μ m (Beckman-Coulter)

Nucleosil[®] 100-5 C18, 5 μ m, 250 x 4 mm (Macherey-Nagel)

program: Chromeleon[™] 6.11 build 490

■ *Další přístroje:*

pH metr ATI Orion 370 s kombinovanou elektrodou

magnetická míchačka Variomag, Monotherm

sonikátor ELMAsonic E 30 H, P-Lab

Vortex MS 1 Minishaker

vodní lázeň Julabo TW 8

inkubátor Thermomixer compact, Eppendorf

inkubátor G24 Environmental Incubator Shaker

odparka Speed Vac DNA 110 (Savant)

automatické mikropipety

třepačka Microshaker ML-1

fluorimetr Luminiscence Spectrometer Perkin Elmer LS-55

aparatura pro elektroforesu Amersham Biosciences

aparatura pro „Western blotting“ Biometra B-43

3.3 METODY

3.3.1 Studium vlivu VPA na oxidaci ellipticinu cytochromy P450

Vliv VPA na oxidaci ellipticinu byl studován za použití jaterních mikrosomů kontrolních (nepremedikovaných) potkanů, jaterních mikrosomů potkanů premedikovaných Sudanem I a jaterních mikrosomů potkanů premedikovaných pregnenolon-16 α -karbonitrilem (PCN).

3.3.1.1 Separace metabolitů ellipticinu tvořených jaterními mikrosomálními systémy kontrolních (nepremedikovaných) potkanů pomocí HPLC

Vliv VPA na oxidaci ellipticinu byl studován za použití jaterních mikrosomů kontrolních (nepremedikovaných) potkanů. Jednotlivé reakční směsi byly připraveny vždy v „tripletech“ (celkem ve třech nezávislých měřeních) o celkovém objemu 500 μ l a obsahovaly následující složky: 0,2 μ M CYP mikrosomální frakce, 10 μ M ellipticin (5 mM zásobní roztok v DMSO), 1 mM NADPH-generující systém (10 mM MgCl₂, 10 mM glukosa-6-fosfát, 1 mM NADP⁺, 1 U/ml glukosa-6-fosfátdehydrogenasy) a fosfátový pufr (100 mM KH₂PO₄, pH 7,4). Do jedné sady inkubačních směsí byl přidán 0,5 mM VPA (50 mM zásobní roztok v destilované vodě), do druhé sady 1 mM VPA (50 mM zásobní roztok v destilované vodě). Dále byly připraveny také kontrolní vzorky bez přídavku VPA.

Všechny složky byly do inkubačních směsí přidávány v takovém množství, aby jejich zastoupení ve vzorku odpovídalo uvedeným koncentracím. Směs byla doplněna pufrům do 500 μ l.

Reakce byla startována přidáním 50 μ l 10 mM NADPH-generujícího systému (10 mM MgCl₂, 10 mM glukosa-6-fosfát, 1 mM NADP⁺, 1 U/ml glukosa-6-fosfátdehydrogenasy), dokonale promíchána a inkubována 20 minut za stálého třepání při 350 RPM (Thermomixer compact, Eppendorf) a 37°C v otevřených mikrozkuřkách (Eppendorf). Dále byl k reakční směsi přidán 10 μ M fenacetin (5 μ l zásobního 1 mM roztoku v MeOH) jako vnitřní standard. Reakce byla zastavena přidáním 1 ml ethylesteru kyseliny octové a následným intenzivním protřepáním. Reakční směs byla extrahována ethylacetátem dvouminutovým třepáním (Microshaker ML-1). Pro důkladné oddělení obou fází byla směs centrifugována po dobu 3 minut při 13 000 RPM (Microcentaur MSE). Horní

organická vrstva s extrahovanými produkty byla odebrána a extrakce ještě jednou zopakována přidáním 1 ml ethylesteru kyseliny octové ke zbylé vodné fázi. Směs byla odpařena na vakuové odparce „Speed Vac“ (DNA 110, firma Savant) do sucha. Těsně před analýzou byl vzorek rozpuštěn v 25 µl methanolu.

Metabolity ellipticinu vzniklé reakcí v inkubačních směsích byly separovány vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na reverzní fází (RP-HPLC) (Dionex pump P580, ASI-100 Automated Sample Injector, UV/VIS Detector UVD 170S/340S). Separace metabolitů byla prováděna na koloně Ultrasphere, ODS, C18, 250 x 4,6 mm, 5µm (Beckman-Coulter) při teplotě 35°C a průtoku mobilní fáze 0,7 ml/min. K separaci docházelo izokratickou elucí mobilní fází o složení 64% methanol, 36% destilovaná voda, 0,005 M kyselina 1-heptansulfonová a 0,032 M kyselina octová. Mobilní fáze byla před použitím sonikována pro odstranění vzduchu. Metabolity byly detekovány při vlnové délce 296 nm a pro kvantifikaci byla jejich plocha vztažena k ploše píku vnitřního standardu fenacetinu.

3.3.1.2 Separace metabolitů ellipticinu tvořených jaterními mikrosomálními systémy potkanů premedikovaných Sudanem I pomocí HPLC

Vliv VPA na oxidaci ellipticinu byl dále studován za použití jaterních mikrosomů potkanů premedikovaných Sudanem I. Jednotlivé reakční směsi byly připraveny vždy v „dubletech“ (celkem ve třech nezávislých měřeních) o celkovém objemu 500 µl. Příprava inkubačních směsí a celý postup separace byly totožné s postupem uvedeným v podkapitole 3.3.1.1.

3.3.1.3 Separace metabolitů ellipticinu tvořených jaterními mikrosomálními systémy potkanů premedikovaných PCN pomocí HPLC

Vliv VPA na oxidaci ellipticinu byl také studován za použití jaterních mikrosomů potkanů premedikovaných PCN. Jednotlivé reakční směsi byly připraveny vždy v „dubletech“ (celkem ve třech nezávislých měřeních) o celkovém objemu 500 µl. Příprava inkubačních směsí a celý postup separace byly totožné s postupem uvedeným v podkapitole 3.3.1.1.

3.3.2 Sledování vlivu VPA na aktivity cytochromů P450 podrodin 1A a 3A

Mezi nejsnazší způsoby zjištění metabolické aktivity vybrané isoformy CYP patří sledování metabolismu selektivního substrátu příslušné isoformy, tzv. „markerového“ substrátu, tj. látky, která se v ideálním případě metabolizuje výhradně danou isoformou.^[116]

3.3.2.1 Separace metabolitů Sudanu I pomocí HPLC

Pro sledování vlivu VPA na aktivitu cytochromu P450 1A1 bylo využito „markerového“ substrátu Sudanu I.^[117]

Oxidace Sudanu I byla studována za použití jaterních mikrosomů potkanů premedikovaných Sudanem I. Sudan I je totiž nejen substrátem CYP1A1^[117], ale také induktorem cytochromů P450 podrodiny 1A^[118]. Jednotlivé reakční směsi byly připraveny vždy v „tripletech“ (celkem ve čtyřech nezávislých měřeních) o celkovém objemu 500 µl a obsahovaly následující složky: 0,2 µM CYP mikrosomální frakce, 1 mM NADPH, 50 µM Sudan I (5 mM zásobní roztok v MeOH) a fosfátový pufr (100 mM KH₂PO₄, pH 7,4). Do jedné sady inkubačních směsí byl přidán 0,5 mM VPA (50 mM zásobní roztok v destilované vodě), do druhé sady 1 mM VPA (50 mM zásobní roztok v destilované vodě). Dále byly připraveny také kontrolní vzorky bez přídavku VPA.

Všechny složky byly do inkubačních směsí přidávány v takovém množství, aby jejich zastoupení ve vzorku odpovídalo uvedeným koncentracím. Směs byla doplněna pufrům do 500 µl.

Po 5 minutách preinkubace při 37°C (vodní lázeň Julabo TW 8) byla reakce startována přidáním 5 µl 5 mM roztoku Sudanu I, dokonale promíchána a dále inkubována 20 minut za stálého třepání (G24 Environmental Incubator Shaker) a 37°C ve skleněných zkumavkách. Reakce byla zastavena přidáním 1 ml ethylesteru kyseliny octové a následným intenzivním protřepáním. Reakční směs byla extrahována ethylacetátem 2 minuty na „vortexu“ a pro důkladné oddělení obou fází byla směs centrifugována po dobu 3 minut při 8 000 RPM (centrifuga T 52,2). Horní organická vrstva s extrahovanými produkty byla odebrána a extrakce ještě jednou zopakována přidáním 1 ml ethylesteru kyseliny octové ke zbylé vodné fázi. Směs byla odpařena na vakuové odparce „Speed Vac“ (DNA 110, firma Savant) do sucha. Těsně před analýzou byl vzorek rozpuštěn v 30 µl methanolu.

Metabolity Sudanu I (4',6-dihydroxy-Sudan I, 6-hydroxy-Sudan I a 4'-hydroxy-Sudan I) vzniklé reakcí v inkubačních směsích byly separovány pomocí RP-HPLC (Dionex pump P580, ASI-100 Automated Sample Injector, UV/VIS Detector UVD 170S/340S). Separace metabolitů byla prováděna na koloně Nucleosil® 100-5 C18, 5 µm, 250 x 4 mm (Macherey-Nagel) při teplotě 35°C a průtoku mobilní fáze 0,7 ml/min. K separaci docházelo izokratickou elucí mobilní fází o složení MeOH: NH₄HCO₃ (0,1 M, pH 8,5) (9:1, v/v). Mobilní fáze byla před použitím sonikována pro odstranění vzduchu. Metabolity Sudanu I byly detekovány při vlnové délce 480 nm a jejich množství bylo kvantifikováno podle kalibrační křivky získané za použití syntetických standardů metabolitů Sudanu I.^[127]

3.3.2.2 Separace metabolitu testosteronu tvořeného jaterními mikrosomálními systémy kontrolních (nepremedikovaných) potkanů pomocí HPLC

Pro sledování vlivu VPA na aktivitu cytochromů P450 podrodiny 3A byla využita „markerová“ reakce, 6-β-hydroxylace testosteronu.^[119]

Metabolismus testosteronu byl studován za použití jaterních mikrosomů kontrolních (nepremedikovaných) potkanů. Jednotlivé reakční směsi byly připraveny vždy v „dubletech“ (celkem ve čtyřech nezávislých měřeních) o celkovém objemu 500 µl a obsahovaly následující složky: 0,4 mg/ml proteinů mikrosomální frakce, 0,05 mM testosteron (10 mM zásobní roztok v MeOH), 1 mM NADPH-generující systém (10 mM MgCl₂, 10 mM glukosa-6-fosfát, 1 mM NADP⁺, 1 U/ml glukosa-6-fosfátdehydrogenasy) a fosfátový pufr (100 mM KH₂PO₄, pH 7,4). Do jedné sady inkubačních směsí byl přidán 0,5 mM VPA (50 mM zásobní roztok v destilované vodě), do druhé sady 1 mM VPA (50 mM zásobní roztok v destilované vodě). Dále byly připraveny také kontrolní vzorky bez přídavku VPA.

Všechny složky byly do inkubačních směsí přidávány v takovém množství, aby jejich zastoupení ve vzorku odpovídalo uvedeným koncentracím. Směs byla doplněna pufrům do 500 µl.

Po 5 minutách preinkubace při 37°C (Thermomixer compact, Eppendorf) byla reakce startována přidáním 50 µl 10 mM NADPH-generujícího systému, dokonale promíchána a inkubována 15 minut za stálého třepání při 400 RPM (Thermomixer compact, Eppendorf) a 37°C v otevřených mikrozkuřkách (Eppendorf). Reakce byla zastavena přidáním 100 µl roztoku 1 M Na₂CO₃/2 M NaCl a následným intenzivním protřepáním.

Dále byl k reakční směsi přidán 10 μM fenacetin (5 μl zásobního 1 mM roztoku v MeOH) jako vnitřní standard a 1 ml dichlormethanu. Reakční směs byla extrahována dichlormethanem dvouminutovým třepáním (Microshaker ML-1). Pro důkladné oddělení obou fází byla směs centrifugována po dobu 3 minut při 13 000 RPM (Microcentaur MSE). Spodní organická vrstva s extrahovanými produkty byla odebrána a extrakce ještě jednou zopakována přidáním 1 ml dichlormethanu ke zbylé vodné fázi. Směs byla odpařena na vakuové odparce „Speed Vac“ (DNA 110, firma Savant) do sucha. Těsně před analýzou byl vzorek rozpuštěn v 25 μl methanolu.

Metabolit testosteronu (6- β -hydroxytestosteron) vzniklý reakcí v inkubačních směsích byl separován od testosteronu pomocí RP-HPLC (Dionex pump P580, ASI-100 Automated Sample Injector, UV/VIS Detector UVD 170S/340S). Separace metabolitu byla prováděna na koloně Nucleosil[®] 100-5 C18, 5 μm , 250 x 4 mm (Macherey-Nagel) při teplotě 35°C a průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min. K separaci docházelo izokratickou elucí mobilní fází o složení 75% methanol, 25% destilovaná voda. Mobilní fáze byla před použitím sonikována pro odstranění vzduchu. 6- β -hydroxytestosteron byl detekován při vlnové délce 254 nm a pro kvantifikaci byla jeho plocha vztažena k ploše píku vnitřního standardu fenacetinu.

3.3.2.3 Separace metabolitů testosteronu tvořených jaterními mikrosomálními systémy potkanů premedikovaných PCN pomocí HPLC

Pro sledování vlivu VPA na aktivitu cytochromů P450 podrodiny 3A byla využita „markerová“ reakce, 6- β -hydroxylace testosteronu^[119], také za použití jaterních mikrosomů potkanů premedikovaných PCN. Tato sloučenina je účinným induktorem cytochromů P450 podrodiny 3A.^[120] Jednotlivé reakční směsi byly připraveny vždy v „dubletech“ (celkem ve třech nezávislých měřeních) o celkovém objemu 500 μl . Příprava inkubačních směsí a celý postup separace byly totožné s postupem uvedeným v podkapitole 3.3.2.2.

3.3.2.4 Sledování methoxyresorufin O-demethylační aktivity fluorimetricky

Methoxyresorufin-O-demethylační (MROD) aktivita byla použita jako „markerová“ reakce pro sledování vlivu VPA na aktivitu cytochromu P450 1A2. Tento enzym je majoritním enzymem katalyzujícím demethylaci 7-methoxyresorufinu na jeho fluorescenční produkt resorufin.^[121]

Metabolismus 7-methoxyresorufinu byl studován za použití jaterních mikrosomů potkanů premedikovaných Sudanem I, který je účinným induktorem cytochromů P450 podrodiny 1A.^[118] Jednotlivé reakční směsi byly připraveny vždy v „dubletech“ (celkem ve třech nezávislých měřeních) o celkovém objemu 525 μ l a obsahovaly následující složky: 0,05 μ M CYP mikrosomální frakce, 2,2 μ M 7-methoxyresorufin (0,2 mM zásobní roztok v DMSO) a fosfátový pufr (100 mM KH_2PO_4 , pH 7,4). Do jedné sady inkubačních směsí byl přidán 0,5 mM VPA (50 mM zásobní roztok v destilované vodě), do druhé sady 1 mM VPA (50 mM zásobní roztok v destilované vodě). Dále byly připraveny také kontrolní vzorky bez přídavku VPA.

Všechny složky byly do inkubačních směsí přidávány v takovém množství, aby jejich zastoupení ve vzorku odpovídalo uvedeným koncentracím. Směs byla doplněna pufrům do 525 μ l.

Do mikrozkupek (Eppendorf) byly pipetovány mikrosomy, pufr a VPA. Tato směs byla inkubována za laboratorní teploty 10 minut. Poté byl přidán 7-methoxyresorufin a následovala inkubace další 2 minuty, opět za laboratorní teploty. Z každé inkubační směsi byly přemístěny aliquoty (150 μ l) do tří jamek 96-ti jamkové destičky. Vždy do jedné jamky bylo přidáno 17 μ l fosfátového pufru (blank), do zbylých dvou jamek bylo pipetováno 17 μ l 5 mM NADPH, čímž byla reakce iniciována. Bezprostředně poté byla měřena fluorescence resorufinu vzniklého v reakčních směsích (Luminiscence Spectrometer Perkin Elmer LS-55). Pro měření byla použita excitační a emisní vlnová délka 530 a 585 nm. Fluorescence byla měřena v deseti 60-ti sekundových cyklech.

Aktivita MROD byla měřena fluorescencí resorufinu. Množství resorufinu vzniklého ve vzorcích bylo odečteno z kalibrační křivky. Kalibrační křivka byla sestavena z 8 bodů (1,875; 3,75; 7,5; 15; 22,5; 30; 45 a 60 pmol resorufinu na jamku). Pro její sestavení byl použit 10 μ M roztok resorufinu v methanolu, který byl na výsledné koncentrace ředěn pufrům (100 mM KH_2PO_4 , pH 7,4).

3.3.3 Studium vlivu VPA na oxidaci ellipticinu peroxidasami

Ellipticin je oxidován nejen cytochromy P450, ale také peroxidasami.^[53] Proto byl vliv VPA na oxidaci ellipticinu studován také za použití peroxidasy, konkrétně laktoperoxidasy (LPO) a křenové peroxidasy (HRP).

3.3.3.1 Separace dimeru ellipticinu tvořeného laktoperoxidasou pomocí HPLC

Vliv VPA na oxidaci ellipticinu byl studován za použití laktoperoxidasy. Jednotlivé reakční směsi byly připraveny vždy v „dubletech“ (celkem ve třech nezávislých měřeních) o celkovém objemu 500 μ l a obsahovaly následující složky: 10 μ g/ml LPO, 10 μ M ellipticin (5 mM zásobní roztok v MeOH), 100 μ M H₂O₂ (10 mM zásobní roztok v destilované vodě) a fosfátový pufr (100 mM KH₂PO₄, pH 7,4). Do jedné sady inkubačních směsí byl přidán 0,5 mM VPA (50 mM zásobní roztok v destilované vodě), do druhé sady 1 mM VPA (50 mM zásobní roztok v destilované vodě). Dále byly připraveny také kontrolní vzorky bez přídavku VPA.

Všechny složky byly do inkubačních směsí přidávány v takovém množství, aby jejich zastoupení ve vzorku odpovídalo uvedeným koncentracím. Směs byla doplněna pufrům do 500 μ l.

Reakce byla startována přidáním 5 μ l 10 mM H₂O₂, dokonale promíchána a inkubována 20 minut za stálého třepání při 350 RPM (Thermomixer compact, Eppendorf) a 37°C v otevřených mikrozkuřkách (Eppendorf). Reakce byla zastavena přidáním 1 ml ethylesteru kyseliny octové a následným intenzivním protřepáním. Reakční směs byla extrahována ethylacetátem dvouminutovým třepáním (Microshaker ML-1). Pro důkladné oddělení obou fází byla směs centrifugována po dobu 3 minut při 13 000 RPM (Microcentaur MSE). Horní organická vrstva s extrahovanými produkty byla odebrána a extrakce ještě jednou zopakována přidáním 1 ml ethylesteru kyseliny octové ke zbylé vodné fázi. Směs byla odpařena na vakuové odparce „Speed Vac“ (DNA 110, firma Savant) do sucha. Těsně před analýzou byl vzorek rozpuštěn v 25 μ l methanolu.

Metabolit ellipticinu (dimer ellipticinu) vzniklý reakcí v inkubačních směších byl separován od ellipticinu pomocí RP-HPLC (Dionex pump P580, ASI-100 Automated Sample Injector, UV/VIS Detector UVD 170S/340S). Separace metabolitu byla prováděna na koloně Nucleosil[®] 100-5 C18, 5 μ m, 250 x 4 mm (Macherey-Nagel) při teplotě 35°C a průtoku mobilní fáze 0,8 ml/min. K separaci docházelo gradientovou elucí (*Tabulka 2, str. 56*) mobilních fází o složení:

A: 55% octan amonný (100 mM, pH 2,8), 45% methanol

B: 10% octan amonný (100 mM, pH 2,8), 90% methanol

Tabulka 2: Průběh gradientu použitý pro separaci metabolitů ellipticinu

| čas [min] | %B (mobilní fáze) | průtok |
|-----------|-------------------|--------|
| 0 | 0 | 0,8 |
| 12,5 | 0 | 0,8 |
| 22,5 | 100 | 0,8 |
| 25 | 100 | 0,8 |
| 27,5 | 0 | 0,8 |
| 30 | stop | 0,8 |

Mobilní fáze byly před použitím sonikovány pro odstranění vzduchu. Ellipticin a dimer ellipticinu byly detekovány při vlnové délce 296 nm.

3.3.3.2 Separace dimeru ellipticinu tvořeného křenovou peroxidasou pomocí HPLC

Vliv VPA na oxidaci ellipticinu byl také studován za použití křenové peroxidasy. Jednotlivé reakční směsi byly připraveny vždy v „dubletech“ (celkem ve třech nezávislých měřeních) o celkovém objemu 500 µl a obsahovaly následující složky: 1,25 µg/ml HRP, 10 µM ellipticin (5 mM zásobní roztok v MeOH), 100 µM H₂O₂ (10 mM zásobní roztok v destilované vodě) a fosfátový pufr (100 mM KH₂PO₄, pH 7,4). Do jedné sady inkubačních směsí byl přidán 0,5 mM VPA (50 mM zásobní roztok v destilované vodě), do druhé sady 1 mM VPA (50 mM zásobní roztok v destilované vodě). Dále byly připraveny také kontrolní vzorky bez přídavku VPA. Příprava inkubačních směsí a celý postup separace byly dále totožné s postupem uvedeným v podkapitole 3.3.3.1.

3.3.4 Vliv VPA na expresi enzymů metabolizujících ellipticin v neuroblastomových buněčných liniích

V neuroblastomových buněčných liniích (UKF-NB-3, UKF-NB-4) byl sledován vliv VPA na expresi CYP1A1, CYP3A4 a LPO. Neuroblastomové buněčné linie byly preinkubovány s 1 mM a 2 mM VPA (roztok VPA v Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM)) po dobu 24 hodin. Poté byly tyto buňky inkubovány s 10 µM ellipticinem po dobu 72 hodin. Kontrolní neuroblastomové buněčné linie byly inkubovány s 1 µM a 10 µM ellipticinem po dobu 72 hodin (bez předchozí preinkubace s VPA) nebo byla inkubace zcela vynechána. Buněčné neuroblastomové linie byly pěstovány RNDr. J. Poljakovou, Ph.D.

3.3.4.1 Extrakce proteinů z buněčných linií

Pelety jednotlivých buněčných linií (UKF-NB-3, UKF-NB-4) získané centrifugací při 600 g byly resuspendovány v přibližně stejném objemu pufru (pH 7,6, 25 mM TRIS/HCl + 150 mM NaCl + 1% detergent NP-40 + 1% deoxycholát sodný + 0,1% SDS), ke kterému byl těsně před použitím přidán inhibitor proteas „Complete“ podle pokynů výrobce (Roche, Švýcarsko). Vzorky byly centrifugovány 20 minut při 14 000 g. Poté byl odebrán supernatant, ve kterém byly stanoveny proteiny. Stanovení koncentrace proteinů bylo provedeno metodou dle Lowryho^[122] se sérovým albuminem jako standardem.

3.3.4.2 SDS-elektroforesa

Pro sledování vlivu VPA na expresi CYP1A1, 3A4 a LPO byla provedena elektroforesa buněčných lyzátů (viz. podkapitola 3.3.4.1) v přítomnosti dodecylsulfátu sodného na polyakrylamidovém gelu v diskontinuálním prostředí za použití 11% separačního gelu. Pro elektroforesu byla použita aparatura firmy Amersham Biosciences (USA). Po ztuhnutí gelů byly do jamek pipetovány vzorky o koncentracích 10 – 45 µg na jamku. Všechny vzorky byly smíchány se vzorkovým redukujícím pufrem (pH = 6,8; 0,063 M TRIS/HCl; 2% SDS, 10% glycerol, 5% 2-merkapt ethanol, 0,003% bromfenolová modř) v poměru 1:1. Krátce před nanesením do jamek byly všechny vzorky 5 minut povařeny. Elektroforesa probíhala cca 2 hodiny při konstantním proudu 20 mA/1 sklo.

3.3.4.3 Western blotting

Po ukončení elektroforesy byl gel opatrně vyjmut, označen a 20 minut inkubován v „transferovém“ pufru (pH = 8,3; 0,025 M TRIS/HCl; 0,192 M glycin, 10% methanol).

Nitrocelulosaová membrána byla ponořena 5 minut do destilované vody a 15 minut do „transferového“ pufru. Tři kusy chromatografického papíru Whatman byly přiloženy k sobě, ponořeny do „transferového“ pufru a položeny do aparatury pro „Western blotting“ (B-43 Biometra). Na ně byly postupně položeny: gel, membrána a další tři kusy chromatografického papíru, které byly předtím také ponořeny do „transferového“ pufru. Elektropřenos probíhal 50 minut při 4 mA/cm² gelu. Membrána se „sorbovanými“ proteiny byla přes noc blokována v blokovacím pufru [5% odtučněné sušené mléko Milli + PBS (1,8 mM Na₂HPO₄ + 1 mM NaH₂PO₄ + 0,134 M NaCl, pH 7,2) + 0,3% Triton X-100]. Inkubace se specifickou primární polyklonální protilátkou (králíčí proti CYP1A1, králíčí

proti CYP3A4, králičí proti LPO) probíhala přes noc za míchání při teplotě 4°C. Poté byla primární protilátka odmyta „blokovacím pufrem“ (5 x 3 minuty). Membrána byla dále vložena do roztoku sekundární protilátky (kozí IgG proti králičí IgY s konjugovanou křenovou peroxidasou), kde byla inkubována za shodných podmínek 60 minut. Po odmytí sekundární protilátky „blokovacím pufrem“ (4 x 2 minuty) a pufrem TRIS-PBS (5 x 2 minuty) byl komplex antigen-protilátka vizualizován chemiluminiscenčně použitím substrátového „kitu“ (Bio Rad, Immun-Star HRP Substrate) podle pokynů výrobce. Vyvolané sekundární záření pak bylo detekováno citlivým filmem.

3.3.5 Studentův t-test

V předkládané diplomové práci jsou všechny uvedené výsledky průměrem minimálně tří nezávislých měření (každé měření bylo prováděno v „dubletech“ příp. v „tripletech“). K jejich statistickému vyhodnocení byla použita metoda Studentova t-testu^[123,124] (výpočet proveden v programu MS Excel). Sledované hladiny významnosti byly následující: * $p < 0,1$; ** $p < 0,05$; *** $p < 0,01$.

4 Výsledky

4.1 Vliv VPA na oxidaci ellipticinu cytochromy P450 jaterních mikrosomálních systémů potkanů

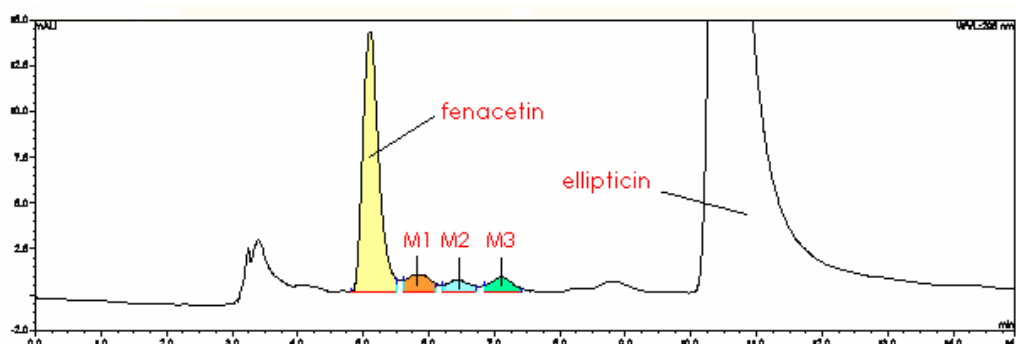
Cytochromy P450 jsou zodpovědné jak za oxidaci ellipticinu na detoxikační metabolity (9-hydroxyellipticin, 7-hydroxyellipticin), tak za metabolickou aktivaci ellipticinu na metabolity schopné tvořit kovalentní adukty s DNA (12-hydroxyellipticin, 13-hydroxyellipticin a N^2 -oxid ellipticinu)^[53], a tak efektivněji poškozovat nádorové buňky. Kim a spolupracovníci publikovali^[125], že cytotoxicitu ellipticinu vůči některým typům nádorových buněk (např. MCF-7 buňky) zvyšují inhibitory histondeacetylas.^[125] Cílem této diplomové práce bylo zjistit, jakým mechanismem může jeden z inhibitorů histondeacetylas, VPA, zvýšenou cytotoxicitu ellipticinu způsobovat. Nejprve bylo zjišťováno, zdali je zvýšená cytotoxicita ellipticinu výsledkem vlivu VPA na metabolismus ellipticinu a enzymy, které ho katalyzují.

Jak již bylo uvedeno v úvodní části práce, majoritními CYP, které metabolizují ellipticin, jsou CYP1A (detoxikace) a CYP3A (aktivace).^[53,68,72] Z toho důvodu byly pro sledování vlivu VPA na oxidaci ellipticinu použity kromě jaterních mikrosomů kontrolních (nepremedikovaných) potkanů, které obsahují přirozené zastoupení jednotlivých isoform CYP, také jaterní mikrosomy potkanů premedikovaných Sudanem I a jaterní mikrosomy potkanů premedikovaných pregnenolon-16 α -karbonitrilem (PCN). Sudan I je znám jako induktor cytochromů P450 podrodiny 1A.^[118] Jaterní mikrosomy potkanů premedikovaných Sudanem I tedy obsahují vyšší koncentrace CYP1A. Jaterní mikrosomy potkanů premedikovaných PCN pak obsahují vyšší množství CYP3A. PCN je totiž induktorem cytochromů P450 podrodiny 3A.^[120]

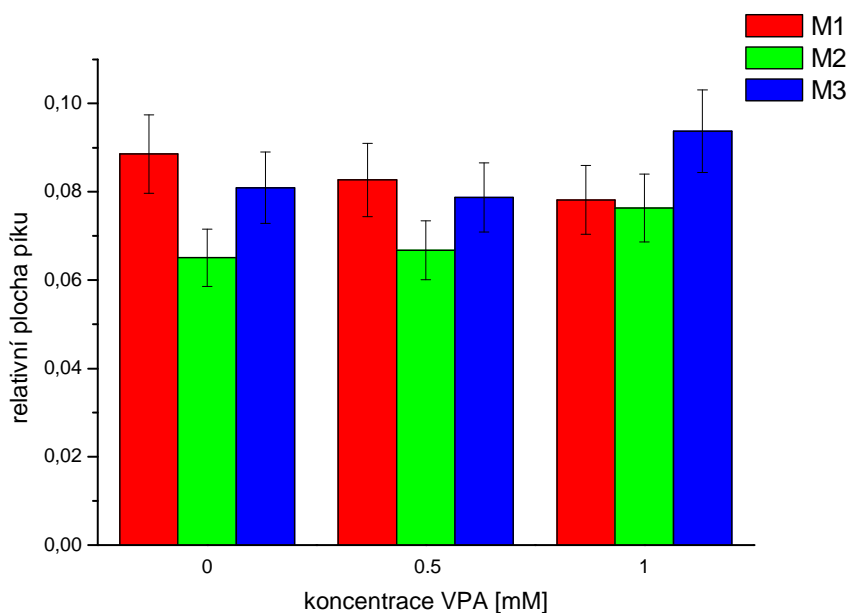
4.1.1 Vliv VPA na oxidaci ellipticinu cytochromy P450 jaterních mikrosomálních systémů kontrolních (nepremedikovaných) potkanů

V první části experimentální práce byl sledován vliv VPA na oxidaci ellipticinu cytochromy P450 přítomnými v játrech (nepremedikovaných) potkanů. Metabolity vzniklé oxidací ellipticinu těmito enzymy byly separovány pomocí RP-HPLC. V dřívějších pracích naší laboratoře^[68,72] bylo zjištěno, že ellipticin je přeměňován cytochromy P450 až na pět metabolitů: M1 – 9-hydroxyellipticin, M2 – 12-hydroxyellipticin, M3 –

13-hydroxyellipticin, M4 – 7-hydroxyellipticin, M5 – N^2 -oxid ellipticinu.^[68,72] Jaterní mikrosomy kontrolních (nepremedikovaných) potkanů použité v našich experimentech oxidovaly ellipticin na tři metabolity: M1 – 9-hydroxyellipticin, M2 – 12-hydroxyellipticin a M3 – 13-hydroxyellipticin (Obrázek 20).



Obrázek 20: RP-HPLC metabolitů ellipticinu tvořených oxidací jaterními mikrosomy kontrolních (nepremedikovaných) potkanů v přítomnosti VPA.



Obrázek 21: Vliv VPA na oxidaci ellipticinu jaterními mikrosomy kontrolních (nepremedikovaných) potkanů. Sledovanými metabolity byly 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2) a 13-hydroxyellipticin (M3). Výsledky uvedené na obrázku jsou průměrné hodnoty \pm standardní odchylky tří nezávislých měření. Výsledky byly hodnoceny pomocí t-testu.

Složení inkubační směsi: 0,2 μ M CYP, 10 μ M ellipticin, 1 mM NADPH-generující systém (10 mM $MgCl_2$, 10 mM glukosa-6-fosfát, 1 mM $NADP^+$, 1 U/ml glukosa-6-fosfátdehydrogenasy), VPA, fosfátový pufr (KH_2PO_4 , pH 7,4).

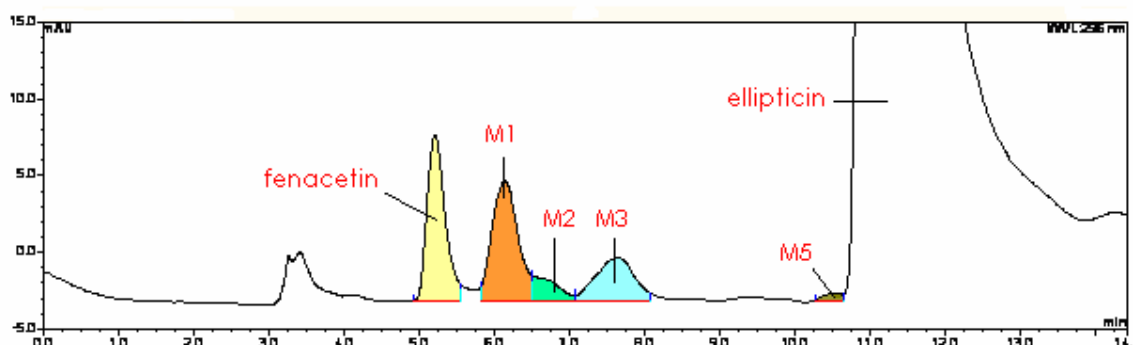
Na *Obrázku 21* (str. 60) jsou uvedeny výsledky získané při sledování vlivu VPA na oxidaci ellipticinu jaterními mikrosomy kontrolních (nepremedikovaných) potkanů. Vyplývá z nich, že VPA tvorbu jednotlivých metabolitů ellipticinu statisticky signifikantně neovlivňoval.

4.1.2 Vliv VPA na oxidaci ellipticinu cytochromy P450 jaterních mikrosomálních systémů potkanů premedikovaných Sudanem I

V další fázi práce studující vlivy VPA na oxidaci ellipticinu cytochromy P450 jsme se zaměřili na ovlivnění jeho detoxikační a aktivační cesty. K oxidaci ellipticinu byly proto použity mikrosomální systémy potkanů premedikovaných látkami, které indukují CYP zodpovědné za metabolismus ellipticinu, a to jak jeho detoxikace (CYP1A), tak aktivace (CYP3A).

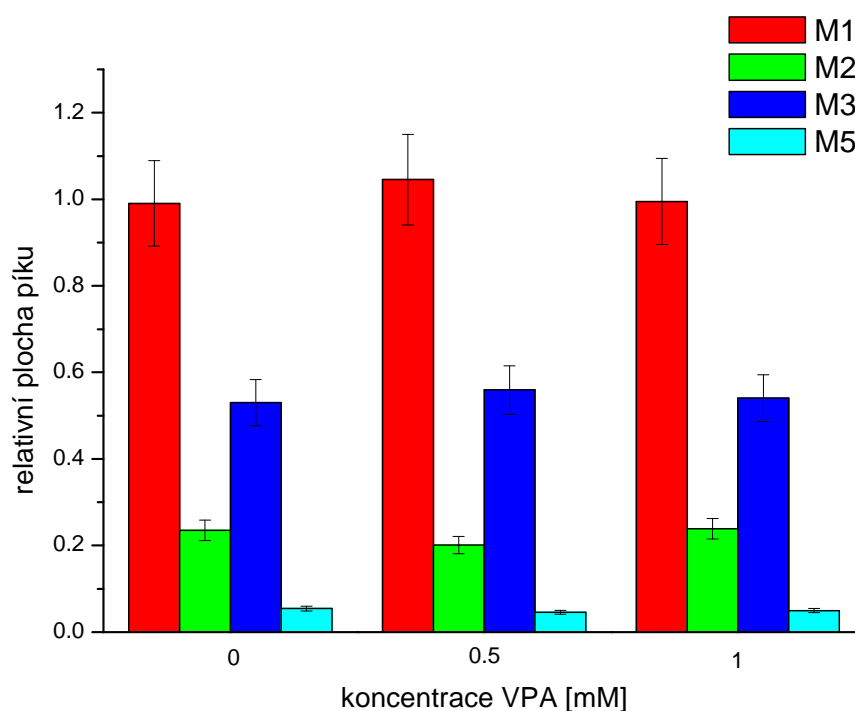
Jak již bylo uvedeno výše, detoxikační metabolity ellipticinu (M1 - 9-hydroxyellipticin, M4 - 7-hydroxyellipticin) jsou tvořeny převážně cytochromy P450 podrodiny 1A^[53,56], proto jsme pro studium vlivu VPA na metabolismus ellipticinu detoxikační cestou použili jaterní mikrosomy potkanů premedikovaných Sudanem I, který je účinným induktorem cytochromů P450 této podrodiny.^[118]

Jaterní mikrosomy potkanů premedikovaných Sudanem I použité v našich dalších experimentech oxidovaly ellipticin na čtyři metabolity: M1 – 9-hydroxyellipticin, M2 – 12-hydroxyellipticin, M3 – 13-hydroxyellipticin a M5 – *N*²-oxid ellipticinu (*Obrázek 22*).



Obrázek 22: RP-HPLC metabolitů ellipticinu tvořených oxidací jaterními mikrosomy potkanů premedikovaných Sudanem I v přítomnosti VPA.

Z výsledků získaných při studiu metabolismu ellipticinu jaterními mikrosomy kontrolních (nepremedikovaných) potkanů (*Obrázek 20, str. 60*) a mikrosomy izolovanými z jater potkanů premedikovaných Sudanem I (*Obrázek 22, str. 61*) vyplývá, že tvorba metabolitu M1 (9-hydroxyellipticin) jaterními mikrosomy potkanů premedikovaných Sudanem I, který je induktorem CYP1A^[118], byla zvýšena oproti kontrolním mikrosomům. Tento výsledek je v souladu s údaji uvedenými v literatuře informujícími o preferenci CYP1A oxidovat ellipticin na 9-hydroxyellipticin a 7-hydroxyellipticin.^[53,56] Navíc při použití jaterních mikrosomů potkanů premedikovaných Sudanem I byl detekován i metabolit M5 (*N*²-oxid ellipticinu), jehož tvorba v minoritním množství za účasti CYP1A již byla také popsána.^[68]



Obrázek 23: Vliv VPA na oxidaci ellipticinu jaterními mikrosomy potkanů premedikovaných Sudanem I. Sledovanými metabolity byly 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3) a *N*²-oxid ellipticinu (M5). Výsledky uvedené na obrázku jsou průměrné hodnoty \pm standardní odchylky tří nezávislých měření. Výsledky byly hodnoceny pomocí t-testu.

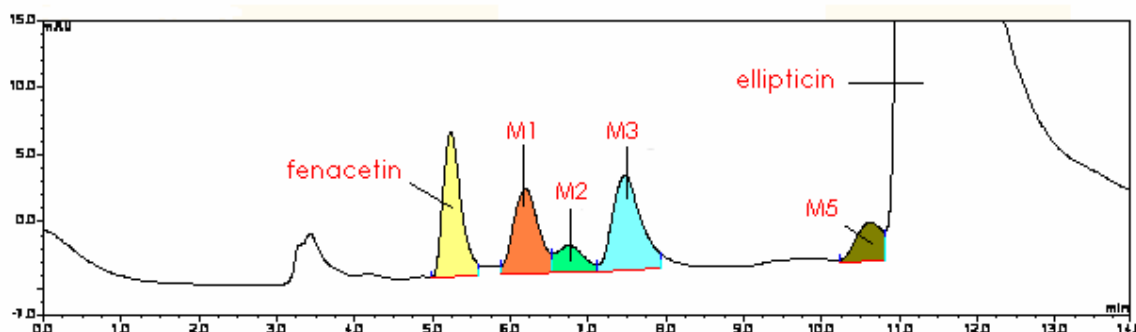
Složení inkubační směsi: 0,2 μ M CYP, 10 μ M ellipticin, 1 mM NADPH-generující systém (10 mM MgCl_2 , 10 mM glukosa-6-fosfát, 1 mM NADP^+ , 1 U/ml glukosa-6-fosfátdehydrogenasy), VPA, fosfátový pufr (KH_2PO_4 , pH 7,4).

Z uvedených výsledků (Obrázek 23, str. 62) je zřejmé, že VPA nemá významný vliv na detoxikační cestu metabolismu ellipticinu katalyzovanou cytochromy P450. Tvorba jednotlivých metabolitů ellipticinu nebyla VPA statisticky signifikantně ovlivněna.

4.1.3 Vliv VPA na oxidaci ellipticinu cytochromy P450 jaterních mikrosomálních systémů potkanů premedikovaných PCN

Jak již bylo uvedeno v úvodní části práce, jsou za metabolickou aktivaci ellipticinu na metabolity schopné tvořit kovalentní adukty s DNA (M2 – 12-hydroxyellipticin, M3 – 13-hydroxyellipticin, M5 – N^2 -oxid ellipticinu) zodpovědné převážně cytochromy P450 podrodiny 3A.^[53] Proto jsme pro studium vlivu VPA na metabolismus ellipticinu aktivační cestou použili jaterní mikrosomy potkanů premedikovaných PCN, účinným induktorem cytochromů P450 podrodiny 3A.^[120]

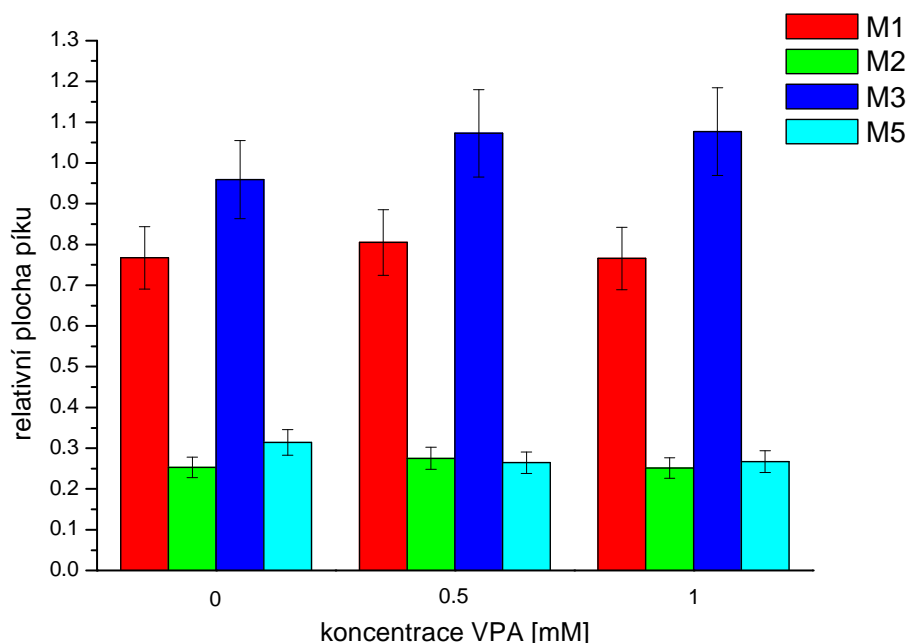
Ellipticin je jaterními mikrosomy potkanů premedikovaných PCN oxidován na čtyři metabolity: M1 – 9-hydroxyellipticin, M2 – 12-hydroxyellipticin, M3 – 13-hydroxyellipticin a M5 – N^2 -oxid ellipticinu (Obrázek 24).



Obrázek 24: RP-HPLC metabolitů ellipticinu tvořených oxidací jaterními mikrosomy potkanů premedikovaných PCN v přítomnosti VPA.

Cytochromy P450 jaterních mikrosomů potkanů premedikovaných PCN (Obrázek 24) potencovaly tvorbu 13-hydroxyellipticinu (M3) oproti enzymům jaterních mikrosomů kontrolních (nepremedikovaných) zvířat (Obrázek 20, str. 60). Navíc enzymy těchto jaterních mikrosomů oxidují ellipticin i na N^2 -oxid ellipticinu (M5). Tyto výsledky potvrzují skutečnost, že CYP3A jsou majoritními enzymy metabolizující ellipticin na 13-hydroxyellipticin a N^2 -oxid ellipticinu.^[53,68,72]

Na *Obrázku 25* jsou uvedeny výsledky získané při sledování vlivu VPA na oxidaci ellipticinu jaterními mikrosomy potkanů premedikovaných PCN. Vyplývá z nich, že VPA nemá významný vliv ani na aktivační cestu metabolismu ellipticinu cytochromy P450. Tvorba jednotlivých metabolitů ellipticinu nebyla VPA statisticky signifikantně ovlivněna.



Obrázek 25: Vliv VPA na oxidaci ellipticinu jaterními mikrosomy potkanů premedikovaných PCN. Sledovanými metabolity byly 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxyellipticin (M3) a N^2 -oxid ellipticinu (M5). Výsledky uvedené na obrázku jsou průměrné hodnoty \pm standardní odchylky tří nezávislých měření. Výsledky byly hodnoceny pomocí t-testu.

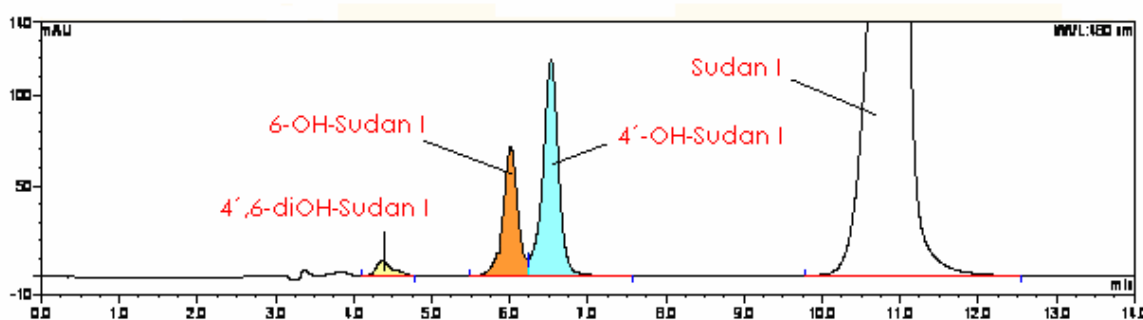
Složení inkubační směsi: 0,2 μ M CYP, 10 μ M ellipticin, 1 mM NADPH-generující systém (10 mM $MgCl_2$, 10 mM glukosa-6-fosfát, 1 mM $NADP^+$, 1 U/ml glukosa-6-fosfátdehydrogenasy), VPA, fosfátový pufr (KH_2PO_4 , pH 7,4).

4.2 Vliv VPA na aktivity cytochromů P450 podrodin 1A a 3A měřené s jejich specifickými („markerovými“) substráty

V další fázi experimentální části diplomové práce jsme zjišťovali, jsou-li VPA ovlivňovány aktivity CYP, které významně participují na oxidaci ellipticinu za použití „markerových“ substrátů těchto enzymů. „Markerové“ substráty jsou substráty, které jsou určitým CYP oxidovány preferenčně.^[116] Pro sledování vlivu VPA na aktivitu CYP1A1 byl využit jako „markerový“ substrát Sudan I.^[117] Pro sledování vlivu VPA na aktivitu CYP3A pak byla využita reakce selektivní pro CYP3A, 6- β -hydroxylace testosteronu.^[119] Pro CYP1A2 pak *O*-demethylace 7-methoxyresorufinu.^[126]

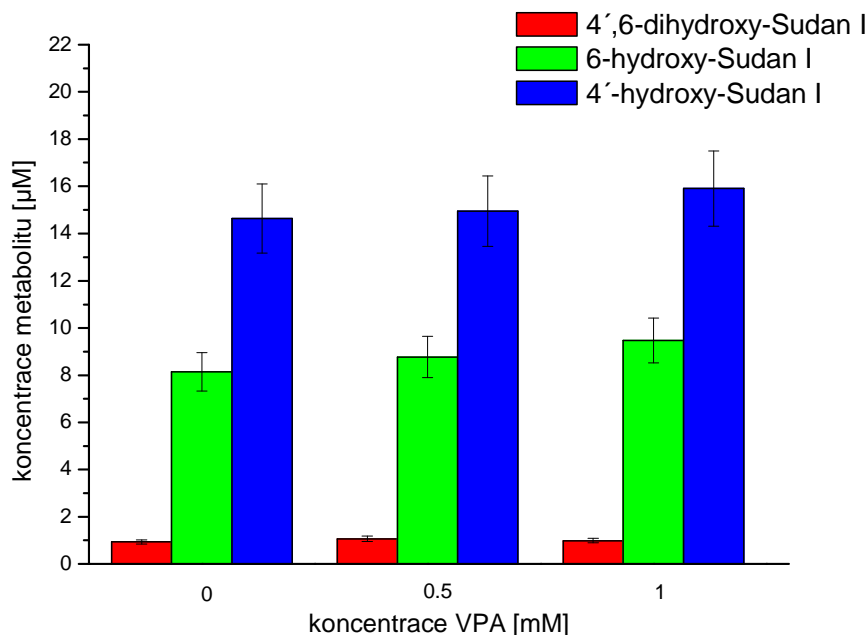
4.2.1 Vliv VPA na oxidaci Sudanu I cytochromem P450 1A1

Podobně jako v případě sledování vlivu VPA na oxidaci ellipticinu, byly k oxidaci Sudanu I použity jaterní mikrosomy potkanů premedikovaných Sudanem I (induktor cytochromů P450 podrodiny 1A^[118]). V pracích naší laboratoře^[117,127] bylo dříve publikováno, že je Sudan I přeměňován cytochromy P450 až na čtyři metabolity: 3',4'-dihydroxy-Sudan I, 4',6-dihydroxy-Sudan I, 6-hydroxy-Sudan I a 4'-hydroxy-Sudan I.^[117,127] Jaterní mikrosomy potkanů premedikovaných Sudanem I použité v našich experimentech oxidovaly Sudan I na tři metabolity: 4',6-dihydroxy-Sudan I, 6-hydroxy-Sudan I a 4'-hydroxy-Sudan I (Obrázek 26).



Obrázek 26: RP-HPLC metabolitů Sudanu I tvořených oxidací jaterními mikrosomy potkanů premedikovaných Sudanem I v přítomnosti VPA.

Z výsledků uvedených na Obrázku 27 (str. 66) vyplývá, že tvorba jednotlivých metabolitů Sudanu I nebyla VPA statisticky signifikantně ovlivněna. VPA tedy nemá žádný vliv na aktivity CYP1A.



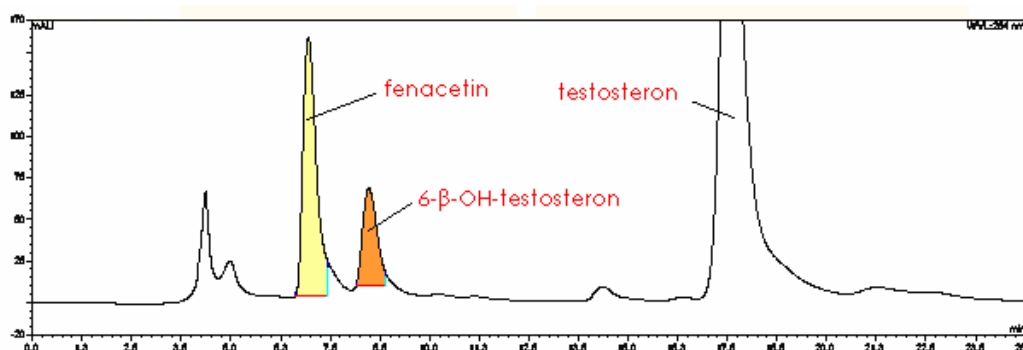
Obrázek 27: Vliv VPA na oxidaci Sudanu I jaterními mikrosomy potkanů premedikovaných Sudanem I. Sledovanými metabolity byly 4',6-dihydroxy-Sudan I, 6-hydroxy-Sudan I a 4'-hydroxy-Sudan I. Výsledky uvedené na obrázku jsou průměrné hodnoty \pm standardní odchylky čtyř nezávislých měření. Výsledky byly hodnoceny pomocí t-testu.

Složení inkubační směsi: 0,2 μ M CYP, 1 mM NADPH, 50 μ M Sudan I, VPA, fosfátový pufr (KH_2PO_4 , pH 7,4).

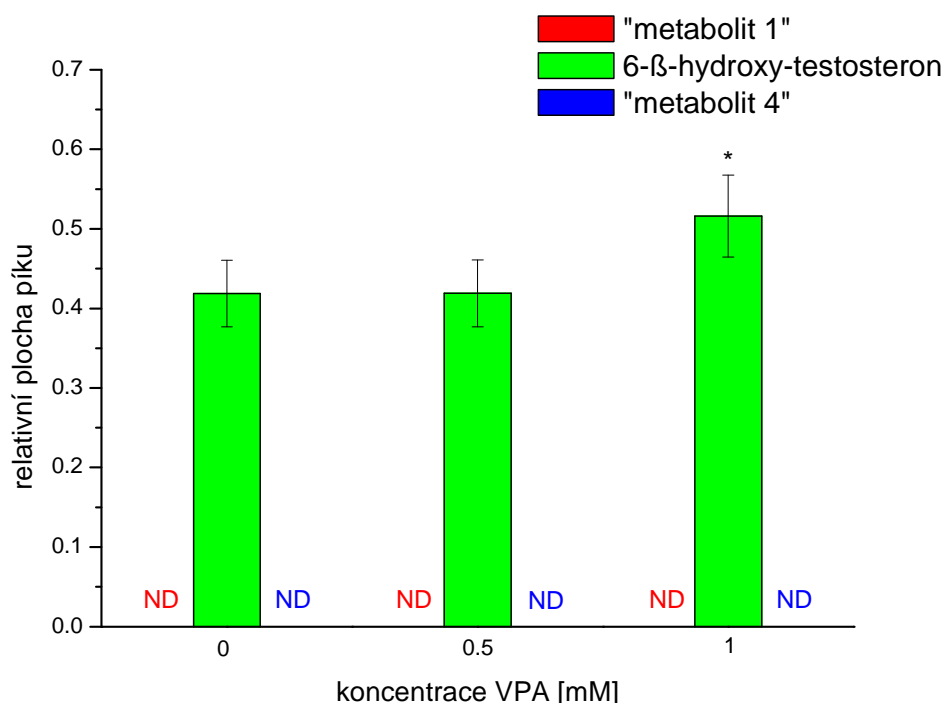
4.2.2 Vliv VPA na 6- β -hydroxylaci testosteronu katalyzovanou cytochromy 450 podrodiny 3A za použití jaterních mikrosomálních systémů kontrolních (nepremedikovaných) potkanů

Vzhledem k významné expresi CYP3A v játrech potkana^[128], bylo v počátečních experimentech sledováno ovlivnění těchto cytochromů P450 VPA v jaterních mikrosomech kontrolních (nepremedikovaných) potkanů.

Pro sledování vlivu VPA na aktivitu CYP3A byla využita reakce selektivní pro CYP3A, 6- β -hydroxylace testosteronu.^[119] Metabolit testosteronu vzniklý CYP3A (6- β -hydroxytestosteron) byl separován od parentálního testosteronu metodou RP-HPLC (Obrázek 28, str. 67).



Obrázek 28: RP-HPLC metabolitu testosteronu tvořeného oxidací jaterními mikrosomy kontrolních (nepremedikovaných) potkanů v přítomnosti VPA.



Obrázek 29: Vliv VPA na oxidaci testosteronu jaterními mikrosomy kontrolních (nepremedikovaných) potkanů. Sledovaným metabolitem byl 6-β-hydroxytestosteron. Další metabolity (jako v případě použití jaterních mikrosomů potkanů premedikovaných PCN - viz. podkapitola 4.2.3.) při použití jaterních mikrosomů kontrolních (nepremedikovaných) potkanů detekovány nebyly (ND = not determined). Výsledky uvedené na obrázku jsou průměrné hodnoty ± standardní odchylky čtyř nezávislých měření. Výsledky byly hodnoceny pomocí t-testu.

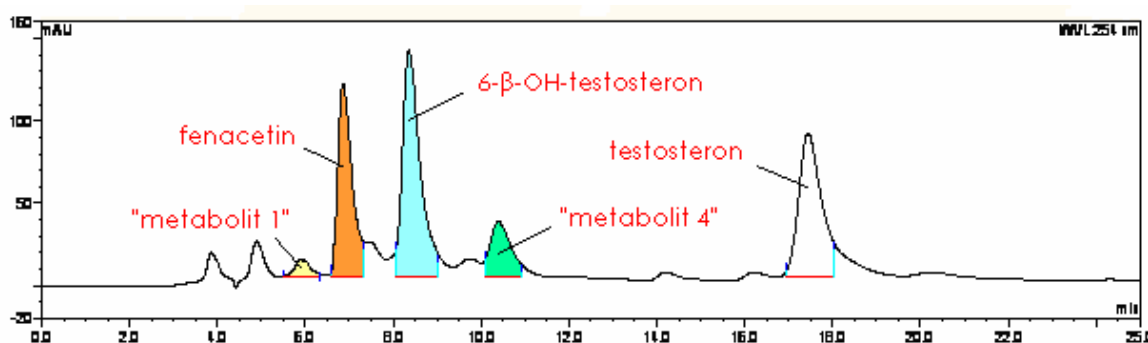
Složení inkubační směsi: 0,4 mg/ml proteinů mikrosomální frakce, 0,05 mM testosteron, 1 mM NADPH-generující systém (10 mM MgCl_2 , 10 mM glukosa-6-fosfát, 1 mM NADP^+ , 1 U/ml glukosa-6-fosfátdehydrogenasy), VPA, fosfátový pufr (KH_2PO_4 , pH 7,4). Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření. Data byla vyhodnocena Studentovým t-testem (* $p < 0,1$; ** $p < 0,05$; *** $p < 0,01$).

Na *Obrázku 29* (str. 67) jsou uvedeny výsledky získané při sledování vlivu VPA na oxidaci testosteronu jaterními mikrosomy kontrolních (nepremedikovaných) potkanů. Z těchto výsledků vyplývá, že VPA v koncentraci 1 mM mírně, nicméně statisticky signifikantně, zvyšoval tvorbu metabolitu testosteronu, 6- β -hydroxytestosteronu. Tato stimulace však byla pouze 1,2 násobná (*Obrázek 29, str. 67*).

4.2.3 Vliv VPA na 6- β -hydroxylaci testosteronu katalyzovanou cytochromy P450 podrodiny 3A za použití jaterních mikrosomálních systémů potkanů premedikovaných PCN

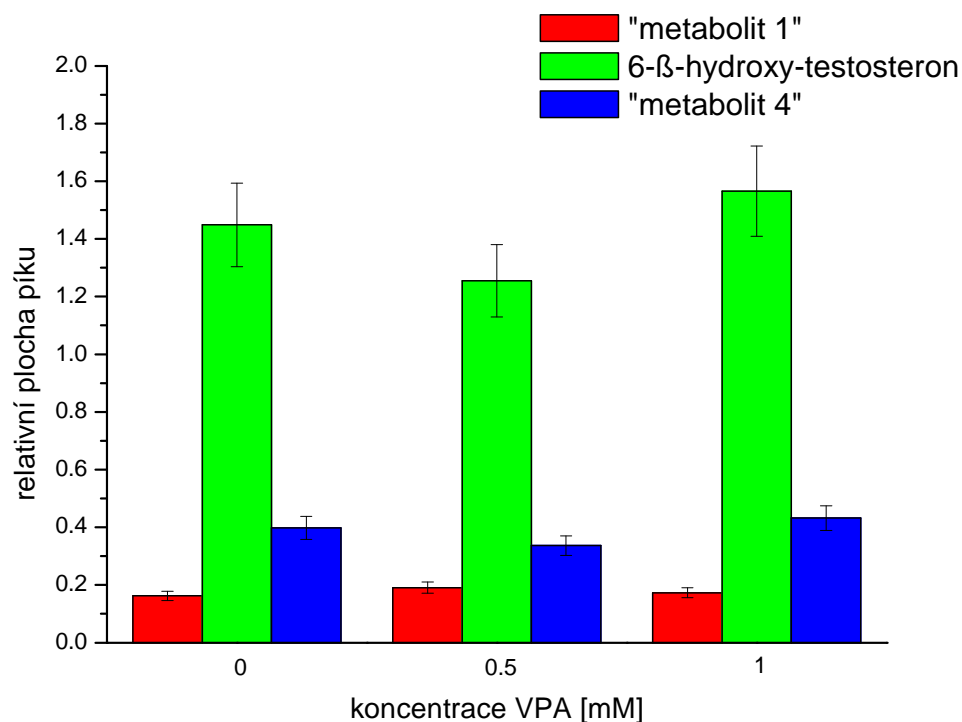
Vedle mikrosomů kontrolních (nepremedikovaných) potkanů byl vliv VPA na 6- β -hydroxylaci testosteronu sledován též v jaterních mikrosomech potkanů premedikovaných PCN, známým induktorem CYP3A.^[120]

Testosteron byl cytochromy P450 jaterních mikrosomů potkanů premedikovaných PCN oxidován na tři metabolity: „metabolit 1 a 4“ s dosud neurčenou strukturou a očekávaný 6- β -hydroxytestosteron (*Obrázek 30*).



Obrázek 30: RP-HPLC metabolitů testosteronu tvořených oxidací jaterními mikrosomy potkanů premedikovaných PCN v přítomnosti VPA.

Z výsledků uvedených na *Obrázku 31* (str. 69) je patrné, že VPA statisticky signifikantně tvorbu jednotlivých metabolitů testosteronu neovlivňoval. Velmi nízká stimulace 6- β -hydroxylace testosteronu katalyzovaná jaterními mikrosomy kontrolních (nepremedikovaných) potkanů (1,2 x) tedy nebyla těmito experimenty potvrzena. Aktivita CYP3A jaterních mikrosomů potkana tedy zřejmě není VPA ovlivněna.



Obrázek 31: Vliv VPA na oxidaci testosteronu jaterními mikrosomy potkanů premedikovaných PCN. Sledovanými metabolity byly „metabolit 1“, 6-β-hydroxytestosteron a „metabolit 4“. (Oxidací testosteronu CYP450 vzniká více metabolitů, my jsme kromě 6-β-hydroxytestosteronu detekovali další dva, ale nevíme, o které se jedná, proto zde označení „metabolit 1“ a „metabolit 4“. Označení zvoleno podle pořadí příslušného píku v chromatogramu). Výsledky uvedené na obrázku jsou průměrné hodnoty \pm standardní odchylky tří nezávislých měření. Výsledky byly hodnoceny pomocí t-testu.

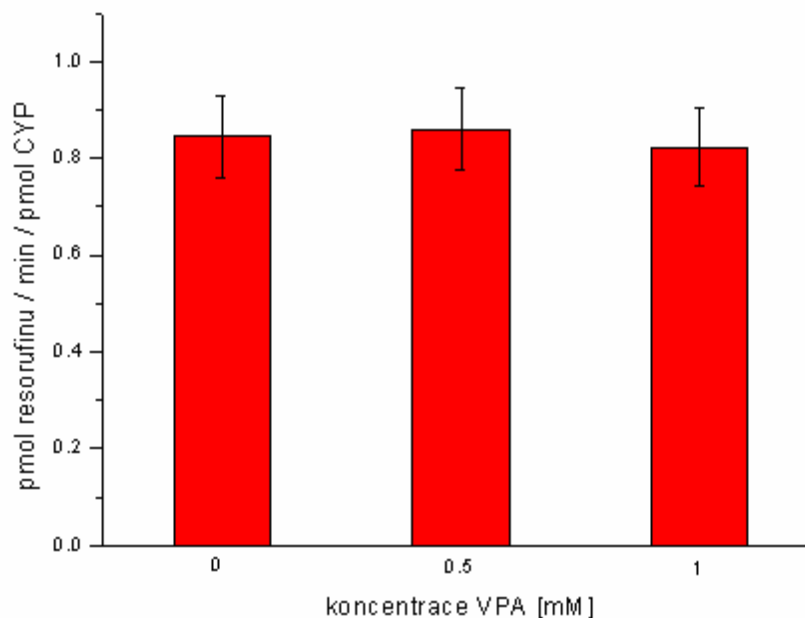
Složení inkubační směsi: 0,4 mg/ml proteinů mikrosomální frakce, 0,05 mM testosteron, 1 mM NADPH-generující systém (10 mM MgCl_2 , 10 mM glukosa-6-fosfát, 1 mM NADP^+ , 1 U/ml glukosa-6-fosfátdehydrogenasy), VPA, fosfátový pufr (KH_2PO_4 , pH 7,4).

4.2.4 Vliv VPA na O-demethylaci 7-methoxyresorufinu katalyzovanou cytochromem P450 1A2

O-Demethylace 7-methoxyresorufinu je známá jako „markerová“ reakce katalyzovaná CYP1A2.^[126]

Ke sledování ovlivnění O-demethylace 7-methoxyresorufinu VPA byly použity jaterní mikrosomy potkanů premedikovaných Sudanem I, nabohacené cytochromy P450 podrodiny 1A.^[118] Metabolit vzniklý reakcí, resorufin, byl detekován fluorimetricky.

Na *Obrázku 32* jsou uvedeny výsledky získané při sledování vlivu VPA na *O*-demethylaci 7-methoxyresorufinu. Vyplývá z nich, že tvorba resorufinu nebyla VPA statisticky signifikantně ovlivněna.



Obrázek 32: Vliv VPA na *O*-demethylaci 7-methoxyresorufinu jaterními mikrosomy potkanů premedikovaných Sudanem I. Sledovaným metabolitem byl resorufin. Výsledky uvedené na obrázku jsou průměrné hodnoty \pm standardní odchylky tří nezávislých měření. Výsledky byly hodnoceny pomocí t-testu.

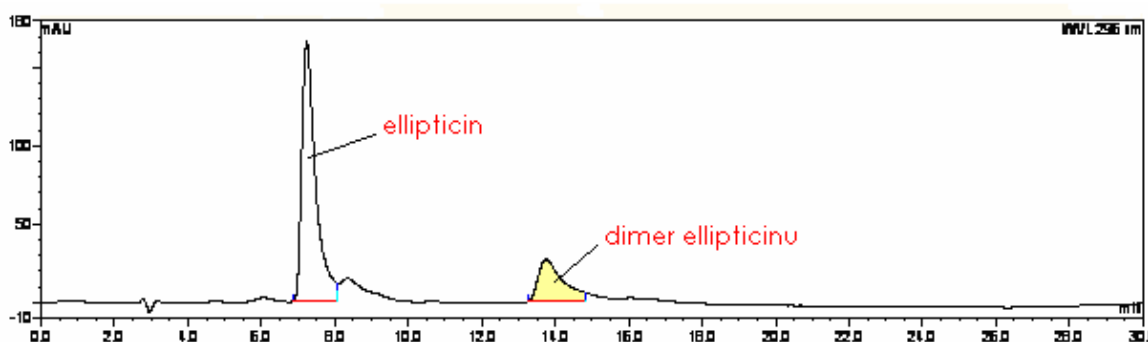
Složení inkubační směsi: 0,05 μ M CYP, 2,2 μ M 7-methoxyresorufin, VPA, fosfátový pufr (KH_2PO_4 , pH 7,4).

4.3 Vliv VPA na oxidaci ellipticinu peroxidasami

Ellipticin je metabolizován na biologicky účinnější deriváty nejen cytochromy P450, ale také peroxidasami.^[53] Proto jsme též sledovali vliv VPA na metabolismus ellipticinu těmito enzymy. Ellipticin je peroxidasami přeměňován na 2 metabolity: majoritní dimer ellipticinu a minoritní N^2 -oxid ellipticinu.^[53] V dalších experimentech byla sledována pouze tvorba majoritního metabolitu, dimeru ellipticinu.

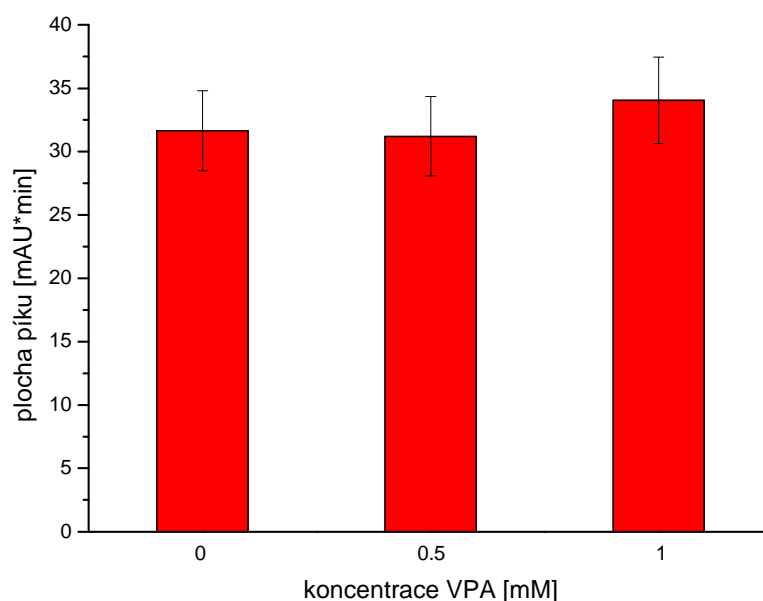
4.3.1 Vliv VPA na oxidaci ellipticinu laktoperoxidasou

Dimer ellipticinu vzniklý laktoperoxidasou byl separován od parentální molekuly metodou RP-HPLC (*Obrázek 33*).



Obrázek 33: RP-HPLC metabolitu vzniklého oxidací ellipticinu laktoperoxidasou v přítomnosti VPA.

Z výsledků uvedených na *Obrázku 34* (str. 72) vyplývá, že tvorba dimeru ellipticinu laktoperoxidasou nebyla VPA ovlivněna.

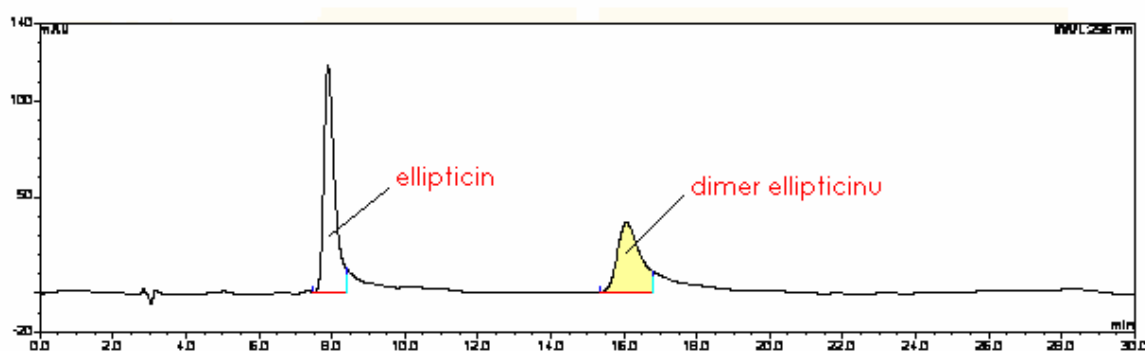


Obrázek 34: Vliv VPA na oxidaci ellipticinu laktoperoxidasou. Sledovaným metabolitem byl dimer ellipticinu. Výsledky uvedené na obrázku jsou průměrné hodnoty \pm standardní odchylky tří nezávislých měření. Výsledky byly hodnoceny pomocí t-testu.

Složení inkubační směsi: 10 $\mu\text{g/ml}$ LPO, 10 μM ellipticin, 100 μM H_2O_2 , VPA, fosfátový pufr (KH_2PO_4 , pH 7,4).

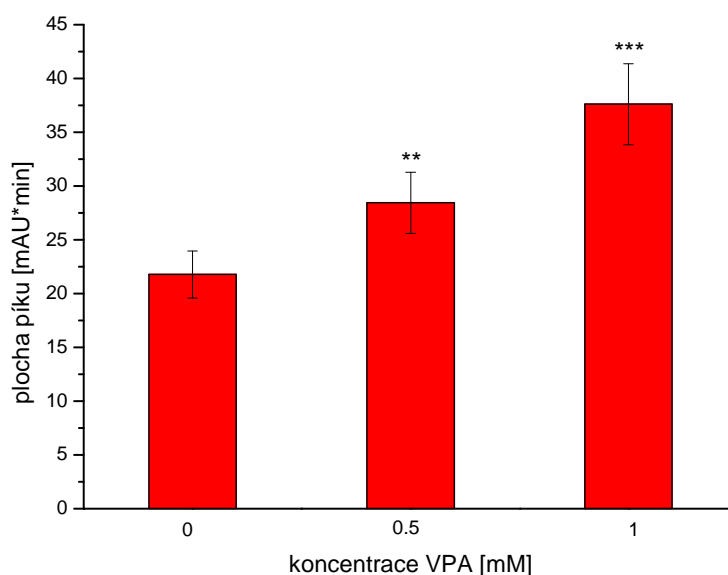
4.3.2 Vliv VPA na oxidaci ellipticinu křenovou peroxidasou

Pro studium vlivu VPA na oxidaci ellipticinu byla použita také křenová peroxidasa. Na *Obrázku 35* je uvedena separace ellipticinu od jeho metabolitu (dimer ellipticinu) tvořeného křenovou peroxidasou pomocí RP-HPLC.



Obrázek 35: RP-HPLC metabolitu vzniklého oxidací ellipticinu křenovou peroxidasou v přítomnosti VPA.

Ze získaných výsledků (*Obrázek 36*) bylo zjištěno, že VPA v koncentracích 0,5 mM a 1 mM statisticky signifikantně zvyšoval tvorbu metabolitu ellipticinu, dimeru ellipticinu.



Obrázek 36: Vliv VPA na oxidaci ellipticinu křenovou peroxidasou. Sledovaným metabolitem byl dimer ellipticinu. Výsledky uvedené na obrázku jsou průměrné hodnoty \pm standardní odchylky tří nezávislých měření. Výsledky byly hodnoceny pomocí t-testu.

Složení inkubační směsi: 1,25 $\mu\text{g/ml}$ HRP, 10 μM ellipticin, 100 μM H_2O_2 , VPA, fosfátový pufr (KH_2PO_4 , pH 7,4). Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření. Data byla vyhodnocena Studentovým t-testem (* $p < 0,1$; ** $p < 0,05$; *** $p < 0,01$).

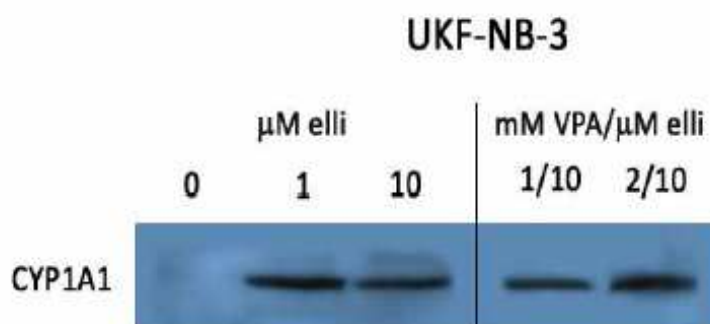
4.4 Vliv VPA na expresi enzymů metabolizujících ellipticin v neuroblastomových buněčných liniích

Dalším cílem diplomové práce bylo zjistit, je-li VPA ovlivněna exprese enzymů, které participují na oxidaci ellipticinu. Tedy enzymy, jejichž ovlivnění VPA bylo sledováno v předchozích experimentech (CYP3A4, CYP1A1, laktoperoxidasa). Expresi enzymů byla sledována v neuroblastomových buněčných liniích, o kterých bylo zjištěno již dříve, že jsou citlivé nejen k ellipticinu^[110], ale také k VPA.^[111-114]

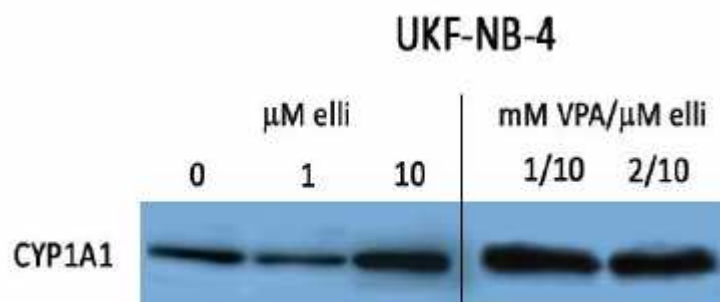
4.4.1 Vliv ellipticinu a VPA na expresi cytochromu P450 1A1 v neuroblastomových buněčných liniích

Metodou „Western blotting“ jsme zjistili, že ellipticin indukuje ve dvou zkoumaných neuroblastomových buněčných liniích (UKF-NB-3 a UKF-NB-4) expresi CYP1A1 (*Obrázek 37, Obrázek 38, str. 75*). Z výsledků tedy vyplývá, že ellipticin působí jako induktor CYP1A1 v těchto buňkách. Tento výsledek je v souladu s poznatky publikovanými v dřívějších pracích, konkrétně údaji o indukčním potenciálu ellipticinu na expresi CYP1A1 v organismu laboratorního potkana.^[129]

VPA v koncentracích 1 a 2 mM však expresi CYP1A1 zvýšenou ellipticinem v neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-3 prakticky neovlivňoval (*Obrázek 37*). Naopak, v neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-4 byla exprese CYP1A1 působením VPA dále zvýšena (*Obrázek 38, str. 75*).



Obrázek 37: Western blot exprese CYP1A1 v neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-3 a vliv VPA na tuto expresi.

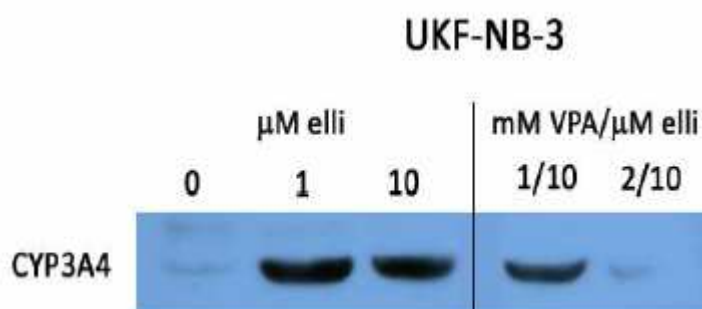


Obrázek 38: Western blot exprese CYP1A1 v neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-4 a vliv VPA na tuto expresi.

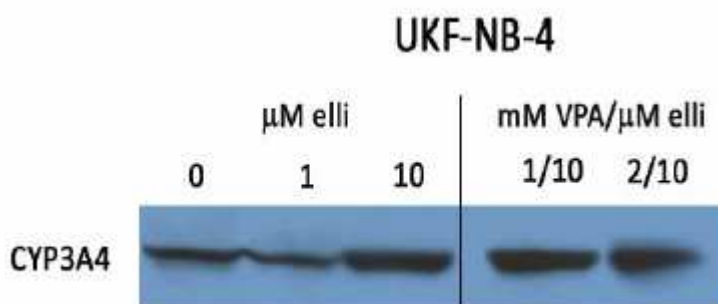
4.4.2 Vliv ellipticinu a VPA na expresi cytochromu P450 3A4 v neuroblastomových buněčných liniích

V dalších experimentech jsme zjistili, že ellipticin ve dvou sledovaných neuroblastomových buněčných liniích (UKF-NB-3 a UKF-NB-4) působí také jako induktor CYP3A4 (*Obrázek 39, Obrázek 40, str. 76*).

VPA v koncentracích 1 a 2 mM však expresi CYP3A4 zvýšenou ellipticinem v neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-3 snižoval (*Obrázek 39*). Naopak v linii UKF-NB-4 exprese CYP3A4 zvýšená ellipticinem VPA ovlivněna nebyla (*Obrázek 40, str. 76*).



Obrázek 39: Western blot exprese CYP3A4 v neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-3 a vliv VPA na tuto expresi.

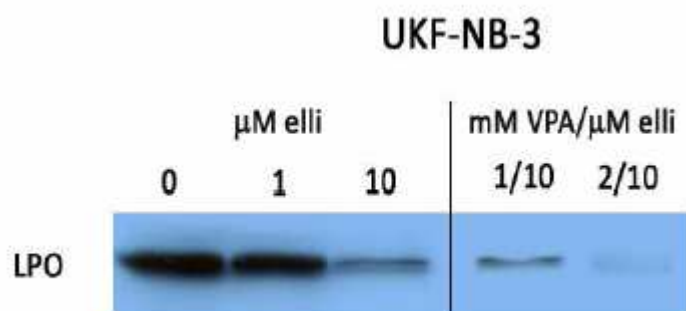


Obrázek 40: Western blot exprese CYP3A4 v neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-4 a vliv VPA na tuto expresi.

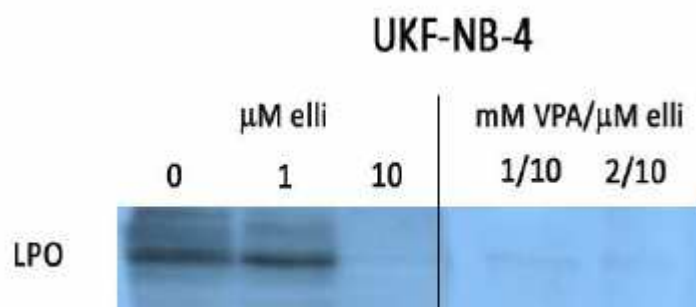
4.4.3 Vliv ellipticinu a VPA na expresi laktoperoxidasy v neuroblastomových buněčných liniích

Ve stejných nádorových buněčných liniích jsme dále sledovali vliv ellipticinu a VPA na expresi laktoperoxidasy. Zjistili jsme, že ellipticin v těchto dvou neuroblastomových buněčných liniích (UKF-NB-3 a UKF-NB-4) expresi této peroxidasy snižuje (*Obrázek 41, Obrázek 42, str. 77*).

VPA v koncentracích 1 a 2 mM pak expresi laktoperoxidasy sníženou ellipticinem v neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-3 dále snižoval (*Obrázek 41*). Obdobný výsledek byl pozorován i v linii UKF-NB-4 (*Obrázek 42, str. 77*).



Obrázek 41: Western blot exprese laktoperoxidasy v neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-3 a vliv VPA na tuto expresi.



Obrázek 42: Western blot exprese laktoperoxidasy v neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-4 a vliv VPA na tuto expresi.

5 Diskuse

Nádorová onemocnění jsou jedním z nejzávažnějších problémů klinické medicíny. Jejich výskyt neustále narůstá a postihuje stále nižší věkové ročníky, což je dáno zejména současným životním stylem (skladba potravy, stres, kontaminace životního prostředí).^[130] Jednou z možností léčby nádorových onemocnění je chemoterapie, tj. léčení chemickými prostředky (kapitola 1.1.3.). Pro chemoterapii zhoubných nádorů jsou používána cytostatika, léky zastavující růst buněk (buněčné dělení). Léčba cytostatiky je systémová léčba, působí tedy na celý organismus. Nepůsobí však výlučně selektivně, tj. pouze na buňky nádoru, ale působí také na různé množící se buňky v těle. Kromě nádorových buněk jsou poškozovány také buňky zdravé (velice citlivé jsou např. bílé krvinky), s čímž souvisí výskyt vedlejších účinků.^[131] Díky znalosti mechanismu působení protinádorových léčiv se optimalizuje používání daného léčiva nebo navrhuje jeho účinnější deriváty s cíleným účinkem pro nádorové buňky.^[130]

V naší laboratoři se zabýváme studiem protinádorových účinků ellipticinu. Ellipticin (kapitola 1.3) je alkaloid izolovaný z rostlin čeledi *Apocyanaceae*. Samotný ellipticin a některé jeho polárnější metabolity (9-hydroxyellipticin, 9-hydroxy- N^2 -methylellipticinium, 9-chloro- N^2 -methylellipticinium a 9-methoxy- N^2 -methylellipticinium) jsou efektivní vůči několika typům rakoviny (kostní metastáze rakoviny prsu, zhoubné nádory ledvin, nádory mozku a myeloblastická leukémie) a vykazují poměrně nízké toxické vedlejší účinky.

Mechanismus působení ellipticinu je založen především na interkalaci do DNA a inhibici topoisomerasy II. V naší laboratoři pak bylo zjištěno, že se ellipticin po enzymové aktivaci kovalentně váže na DNA *in vivo* a *in vitro*. Tento mechanismus by mohl vysvětlovat jeho specifickou protinádorovou aktivitu.

Enzymy zodpovědné za metabolickou aktivaci ellipticinu jsou cytochromy P450 a peroxidasy (kapitoly 1.2.1. a 1.2.2.). Vedle jejich exprese ve zdravých tkáních organismů, jsou exprimovány také v cílových nádorových tkáních (např. nádory prsu exprimují CYP1A1, CYP1B1, CYP2C, CYP2E1, CYP3A4^[132], myeloperoxidasu a laktoperoxidasu^[133]). Metabolity ellipticinu vzniklé oxidací katalyzovanou uvedenými

enzymy generují kovalentní adukty s DNA, a tím efektivněji poškozují tyto nádorové buňky.

Vliv metabolismu ellipticinu na jeho protinádorové účinky byl prokázán nejen dřívějšími studii naší laboratoře^[63-72], ale také ve studii Rekhy a Sladka.^[134] Ti prokázali, že cytotoxicita ellipticinu vůči buněčné linii MCF-7 (buňky lidského prsního adenokarcinomu) závisí na hladině enzymů zodpovědných za metabolickou aktivaci ellipticinu na metabolity schopné kovalentní modifikace DNA. Prokázali, že pokud jsou buňky MCF-7 vystaveny působení 3-methylcholanthrenu (induktor CYP1A), cytotoxické působení ellipticinu vůči této buněčné linii se přechodně zvyšuje. Aktivita a hladina exprese cytochromů P450 a peroxidas tedy mohou být důležitými faktory ovlivňujícími specifitu a cytotoxicitu ellipticinu pro nádorové buňky.

Kromě induktorů enzymů zodpovědných za metabolickou aktivaci ellipticinu existují i další látky, jejichž přítomnost by mohla cytotoxicitu ellipticinu zvýšit. Kim a kol.^[125] publikovali, že cytotoxicitu ellipticinu vůči buněčné linii glioblastomu U118 zvyšují též inhibitory histondeacetylasy. Inhibitory histondeacetylasy (kapitola 1.4) jsou látky, které způsobují hyperacetylaci histonových proteinů chromatinu. Dochází při ní ke ztrátě záporného náboje DNA a rozvolnění chromatinové struktury. DNA se stává přístupnější pro transkripční faktory a další látky.

Předkládaná diplomová práce se zaměřuje na jeden z inhibitorů histondeacetylasy, kyselinu valproovou (VPA). VPA (kapitola 1.4.1.) je malá větvená mastná kyselina (kyselina 2-propylpentanová, $C_8H_{16}O_2$). Již po mnoho let je používána pro léčbu epilepsie. Během posledních let však vyšlo najevo, že vykazuje také protinádorovou aktivitu. Duenas-Gonzales se spolupracovníky^[102] ve své práci uvádějí, že VPA působí cytotoxicky na neuroblastom, nádory prsu, tlustého střeva, štítné žlázy atd.

Jelikož je tedy známo, že jak ellipticin, tak i VPA působí cytotoxicky na nádorové buňky, nabízí se otázka, mohou-li se tato dvě protinádorová agens vzájemně potencovat. V diplomové práci Háčkové^[135] řešené v naší laboratoři bylo zjištěno, že VPA zvyšuje cytotoxicitu ellipticinu vůči lidským neuroblastomovým liniím. Zvýšená cytotoxicita ellipticinu korelovala se zvýšenou tvorbou aduktů ellipticinu s DNA po aplikaci VPA. Zvýšenou tvorbu aduktů ellipticinu s DNA neuroblastomových buněk VPA lze vysvětlit

několika mechanismy. Jedním z nich může být rozvolnění struktury chromatinu, a tím zpřístupnění DNA pro modifikaci ellipticinem. Druhým pak možnost ovlivnění aktivit a exprese enzymů metabolizujících ellipticin působením VPA.

Cílem předkládané diplomové práce bylo testování druhé hypotézy. Vzhledem k tomu, že je VPA metabolizován podobnými enzymy jako ellipticin (cytochromy P450)^[136], zaměřili jsme se na sledování vlivu VPA (i) na oxidaci ellipticinu a (ii) na aktivity cytochromů P450, které na oxidaci ellipticinu významně participují.

Pro sledování vlivu VPA na metabolismus ellipticinu byly prováděny experimenty *in vitro*, ve kterých byly pro oxidaci ellipticinu použity cytochromy P450 a peroxidasy. O těchto enzymech je známo, jak již také bylo v práci několikrát zmíněno, že metabolizují ellipticin jak na metabolity detoxikační (CYP1A, LPO, HRP), tak metabolity schopné tvořit kovalentní adukty s DNA (CYP3A). Metabolismus ellipticinu katalyzovaný CYP1A, CYP3A a laktoperoxidasou prakticky nebyl VPA ovlivněn. Pouze v případě oxidace ellipticinu křenovou peroxidasou byla pozorována stimulace tvorby detoxikačního metabolitu ellipticinu, *N*²-oxidu ellipticinu. To tedy znamená, že VPA stimuloval detoxikační cestu metabolismu ellipticinu katalyzovanou tímto enzymem. V ostatních případech VPA oxidaci ellipticinu neovlivňoval. Proto lze usuzovat, že VPA nezvyšuje cytotoxicitu ellipticinu ovlivněním jeho metabolismu.

Tyto výsledky byly potvrzeny i dalšími experimenty. Konkrétně experimenty sledujícími aktivity CYP participujících na oxidaci ellipticinu za použití jejich specifických „markerových“ substrátů (Sudan I pro CYP1A1, 7-methoxyresorufin pro CYP1A2 a specifická oxidace testosteronu na jeho 6- β -hydroxyderivát katalyzovaná CYP3A).

Další možnost zvýšení cytotoxicity ellipticinu vůči neuroblastomům by též mohla vyplývat z jeho vlivu na expresi studovaných enzymů oxidujících ellipticin.

V další části diplomové práce bylo proto zjišťováno, zdali VPA tuto expresi ovlivňuje. Expres CYP a laktoperoxidasy byly sledovány v lidských neuroblastomových buněčných liniích UKF-NB-3 a UKF-NB-4, kde bylo, jak bylo již zmíněno, zjištěno ovlivnění cytotoxicity ellipticinu působením VPA.^[135] Sledováno bylo, jak VPA ovlivňuje jejich expresi za současné přítomnosti vlastního chemoterapeutika, ellipticinu. Zjistili jsme, že ellipticin samotný je silným induktorem CYP1A1 v těchto nádorových liniích.

Tato skutečnost je v souladu s jeho indukčním potenciálem vůči tomuto enzymu nalezeném v experimentech *in vivo* (potkan).^[129] Zjištěná indukce CYP1A1 ellipticinem je však pouze mírně stimulována přítomností VPA (především v linii UKF-NB-4). Zajímavějším zjištěním byl též nález, že ellipticin indukuje expresi i CYP3A4 ve studovaných neuroblastomových liniích. V tomto případě však VPA tuto indukci neprohlubuje. V případě dalšího sledovaného enzymu oxidujícího ellipticin, laktoperoxidasy, bylo zjištěno, že exprese tohoto enzymu je snižována, a to jak ellipticinem, tak i VPA.

Získané výsledky naznačují, že mechanismus, kterým VPA stimuloval cytotoxicitu ellipticinu vůči neuroblastomům, může vycházet z jeho indukčního potenciálu vůči cytochromům P450, které tuto sloučeninu metabolizují. Zda-li VPA působí i na strukturu chromatinu vedoucí ke zvýšení dostupnosti nukleofilních center DNA pro kovalentní modifikaci ellipticinem bude předmětem dalšího výzkumu naší laboratoře.

6 Závěr

Z výsledků předkládané diplomové práce je patrné, že se její cíle podařilo splnit. V práci bylo zjištěno, že:

- Oxidace ellipticinu cytochromy P450 a laktoperoxidasou *in vitro* není signifikantně ovlivněna valproátem (VPA). Jmenovitě nedochází ke zvýšení tvorby ani těch metabolitů ellipticinu, které tvoří adukty s DNA, ani těch, které jsou metabolity ellipticinu detoxikující.
- Oxidace ellipticinu křenovou peroxidasou *in vitro* na detoxikační metabolit, dimer ellipticinu, je signifikantně stimulována valproátem (VPA).
- Aktivity CYP1A1 a CYP1A2 měřené s jejich specifickými („markerovými“) substráty, Sudanem I a 7-methoxyresorufinem, nejsou valproátem (VPA) ovlivněny.
- Ani aktivita dalšího cytochromu P450, CYP3A, měřená selektivní reakcí, 6- β -hydroxylací testosteronu, není signifikantně ovlivněna valproátem (VPA).
- Ellipticin indukuje expresi CYP1A1 v neuroblastomových buněčných liniích UKF-NB-3 a UKF-NB-4. Tato indukovaná exprese CYP1A1 je však pouze mírně stimulována přítomností VPA.
- Exprese CYP3A4 v neuroblastomových buněčných liniích UKF-NB-3 a UKF-NB-4 byla ellipticinem také indukována. V tomto případě však VPA tuto indukci dále neprohluboval.
- Exprese laktoperoxidasy v neuroblastomových buněčných liniích UKF-NB-3 a UKF-NB-4 je snižována, a to jak ellipticinem, tak i VPA.

Seznam použité literatury

1. Hampl, F., Rádl, S., Paleček, J.: Farmakochemie. Vydavatelství VŠCHT, Praha (2007)
2. Žaloudík, J.: Vyhněte se rakovině aneb prevence zhoubných nádorů pro každého. Grada, Praha (2008)
3. Foretová, L., Navrátilová, M., Hrubá, M.: Využití genetiky pro prevenci a časnou detekci nádorů, v knize Manuál prevence a časně detekce nádorových onemocnění. Masarykův onkologický ústav, Brno, str. 71-81 (2002)
4. Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková, J.: Obecná onkologie a podpůrná léčba. Grada, Praha (2003)
5. Rejthar, A., Vojtěšek, B.: Obecná patologie nádorového růstu. Grada, Praha (2002)
6. Weinberg, R. A.: Jediná odrodilá buňka: jak vzniká rakovina. Academia, Praha (2003)
7. Klener, P.: Protinádorová chemoterapie pro 21. století. Klin. Onkol. 6, 243-248 (2003)
8. Lüllmann, H., Mohr, K., Hein, L.: Barevný atlas farmakologie. Grada, Praha (2007)
9. Klener, P.: Chemoterapie v komplexní léčbě zhoubných nádorů a hemoblastóz. Avicenum, Praha (1987)
10. Kvasničková, E.: Xenobiochemie. Karolinum, Praha (1995)
11. Knejzlík, Z., Káš, J., Ruml, T.: Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. Chem. Listy 94, 913-918 (2000)
12. Večerková, J.: Biotransformace léčiv a její význam pro toxikologickou praxi. Karolinum, Praha (1997)
13. Ledvina, M., Stoklasová, A., Cerman, J.: Biochemie pro studující medicíny II.díl. Karolinum, Praha (2004)
14. Garfinkel, D.: Studies on pig liver microsomes I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. Arch. Biochem. Biophys. 77, 493-509 (1958) – *převzato z 16*

15. Klingenberg, M.: Pigments of rat liver microsomes. Arch. Biochem. Biophys. 75, 376-386 (1958) - *převzato z 16*
16. Dostálek, M.: Enzymatický systém cytochromu P450. Postgraduální medicína 8, 46-54 (2006)
17. Nelson, D. R.: Metazoan cytochrome P450 evolution. Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 369, 15-22 (1998)
18. Wiseman, H., Goldfarb, P., Ridgway, T., Wiseman, A.: Biomolecular free radical toxicity: causes and prevention. John Wiley & Sons, Chichester (2000)
19. Guengerich, F. P.: Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. AAPS J. 8, 101-111 (2006)
20. Hrubý, K., Anzenbacher, P.: Cytochrom P450 – význam v biotransformaci xenobiotik a mezidruhové srovnání. Čs. Fyziol. 46, 34-39 (1997)
21. Guengerich, F. P.: Cytochromes P450, drugs, and diseases. Mol. Interv. 3, 194-204 (2003)
22. Chromá, L., Macková, M., Macek, T., Martínek, V., Stiborová, M.: Rostlinné cytochromy P450 a peroxidasy a jejich úloha při degradaci kontaminantů životního prostředí. Chem. Listy 95, 212 – 222 (2001)
23. He, K., Bornheim, L. M., Falick, A. M., Maltby, D., Yin, H., Correia, M. A.: Identification of the heme-modified peptides from cumene hydroperoxide-inactivated cytochrome P450 3A4. Biochemistry 37, 17448-17457 (1998) - *převzato z 22*
24. Guengerich, F. P.: Human cytochrome P450 enzymes, v knize Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry (Ortiz de Montellano, P. R.). Plenum Press, New York, str. 473-535 (1995) - *převzato z 20 a 21*
25. Nelson, D. R.: Comparison of 450s from human and fugu: 420 milion years of vertebrate P450 evolution. Arch. Biochem. Biophys. 409, 18-24 (2003) – *převzato z 21*
26. Guengerich, F. P.: Role of cytochrome P450 enzymes in drug-drug interactions. Adv. Pharmacol. 43, 7-35 (1997) - *převzato z 16*

27. Moserová, M.: Diplomová práce, PřF UK, katedra biochemie, Praha (2007)
28. Savas, U., Griffin, K. J., Johnson, E. F.: Molecular mechanisms of cytochrome P-450 induction by xenobiotics: an expanded role for nuclear hormone receptors. *Mol. Pharmacol.* 56, 851-857 (1999)
29. Waxman, D. J.: P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR and PPAR. *Arch. Biochem. Biophys.* 369, 11-23 (1999)
30. Conney, A. H.: Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G. H. A: Clowes memorial lecture. *Cancer Res.* 42, 4875-4917 (1982) - *převzato z* Pascussi, J. M., Gerbal-Chaloin, S., Fabre, J. M., Maurel, P., Vilarem, M. J.: Dexamethasone enhances constitutive androstane receptor expression in human hepatocytes: consequences on cytochrome P450 gene regulation. *Mol. Pharmacol.* 58, 1441-1450 (2000)
31. Gasiewicz, T. A., Kende, R. S., Rucci, G., Whitney, B., Willey, J. J.: Analysis of structural requirements for Ah receptor antagonist activity: ellipticines, flavones, and related compounds. *Biochem. Pharmacol.* 52, 1787-1803 (1996)
32. Perdew, G. H.: Association of the Ah receptor with 90-kDa heat shock protein. *J. Biol. Chem.* 263, 13802-13805 (1988)
33. Reyes, H., Reisz-Porszasz, S., Hankinson, O.: Identification of the Ah receptor nuclear translocator (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor. *Science* 256, 1193-1195 (1992) - *převzato z* 31
34. Henry, E. C., Gasiewicz, T. A.: Transformation of the Ah receptor to a DNA-binding form is accompanied by release of hsp90 and increased affinity for TCDD. *Biochem. J.* 294, 95-101 (1993)
35. Elferink, C. J., Gasiewicz, T. A., Whitlock, J. P. Jr: Protein-DNA interactions at a dioxin-responsive enhancer: evidence that the transformed Ah receptor is heteromeric. *J. Biol. Chem.* 265, 20708-20712 (1990)
36. Pollenz, R. S., Sattler, C. A., Poland, A.: The aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein show distinct subcellular

- localizations in Hepa 1clc7 cells by immunofluorescence microscopy. Mol. Pharmacol. 45, 428-438 (1994) - *převzato z 31*
37. Whitlock, J. P. Jr: Mechanistic aspects of dioxin action. Chem. Res. Toxicol. 6, 754-763 (1993) - *převzato z 31*
38. Ledvina, M., Stoklasová, A., Cerman, J.: Biochemie pro studující medicíny I.díl. Karolinum, Praha (2004)
39. Meunier, B.: Horseradish peroxidase: a useful tool for modeling the extra-hepatic biooxidation of exogens. Biochimie 69, 3-9 (1987) - *převzato z 22*
40. Stiborová, M., Asfaw, B., Anzenbacher, P.: Activation of carcinogens by peroxidase. Horseradish peroxidase-mediated formation of benzenediazonium ion from a non-aminoazo dye, 1-phenylazo-2-hydroxynaphthalene (Sudan I) and its binding to DNA. FEBS Lett. 232, 387-390 (1988) - *převzato z 22*
41. Poljaková, J.: Disertační práce, PřF UK, katedra biochemie, Praha (2006)
42. Neidelman, S. L., Giegert, J.: Biohalogenation. Ellins Horwood Limited, London (1986) - *převzato z 22*
43. Smulevich, G., Paoli, M., Burke, J. F., Sanders, S. A., Thorneley, R. N., Smith, A. T.: Characterization of recombinant horseradish peroxidase C and three site-directed mutants, 41V, F41W, and R38K, by resonance Raman spectroscopy. Biochemistry 33, 7398-7407 (1994) - *převzato z 22*
44. Smulevich, G., English, A. M., Mantini, A. R., Marzocchi, M. P.: Resonance Raman investigation of ferric iron in horseradish peroxidase and its aromatic donor complexes at room and low temperatures. Biochemistry 30, 772-779 (1991) - *převzato z 22*
45. de Spiegeleer, P., Sermon, J., Vanoirbeek, K., Aertsen, A., Michiels, CH. W.: Role of porins in sensitivity of Escherichia coli to antibacterial activity of the lactoperoxidase enzyme system. Appl. Envir. Microbiol. 71, 3512-3518 (2005)
46. Ekstrand, B.: Lactoperoxidase and lactoferrin, v knize Natural antimicrobial systems and food preservation (Dillon, V. M, Board, R. G.). CAB International, Wallingford, United Kingdom, str. 15-57 (1994) - *převzato z 45*

47. Kussendrager, K. D., van Hooijdonk, A. C. M.: Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. *Br. J. Nutr.* 84, 19–25 (2000)
48. van Hooijdonk, A. C. M., Kussendrager, K. D., Steijns, J. M.: *In vivo* antimicrobial and antiviral activity of components in bovine milk and colostrum involved in non-specific defense. *Br. J. Nutr.* 84, 127–134 (2000)
49. de Wit, J. N., van Hooijdonk, A. C. M.: Structure, functions and applications of lactoperoxidase in natural antimicrobial systems. *Neth. Milk Dairy J.* 50, 227–244 (1996) - převzato z 45
50. Reiter, B., Härnult, G.: Lactoperoxidase antibacterial system: natural occurrence, biological functions and practical applications. *J. Food Prot.* 47, 724–732 (1984) - převzato z 45
51. Shin, K., Hayasawa, H., Lonnerdal, B.: Inhibition of *Escherichia coli* respiratory enzymes by the lactoperoxidase-hydrogen peroxide-thiocyanate antimicrobial system. *J. Appl. Microbiol.* 90, 489–493 (2001) - převzato z 45
52. Veitch, N. C.: Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry* 65, 249–259 (2004)
53. Stiborová, M., Rupertová, M., Schmeiser, H. H., Frei, E.: Molecular mechanisms of antineoplastic action of an anticancer drug ellipticine. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* 150, 13–23 (2006)
54. Goodwin, S., Smith, A. F., Horning, E. C.: Alkaloids of *Ochrosia Elliptica* Labill. *J. Am. Chem. Soc.* 81, 1903–1908 (1959)
55. <http://australian-insects.com/lepidoptera/plants/apoc/ochrosia-elliptica.jpg> (staženo 26.3.2010)
56. Stiborová, M., Frei, E.: Deriváty ellipticinu s cíleným protinádorovým účinkem. *Chem. Listy* 95, 549–555 (2001)
57. Auclair, C.: Multimodal action of antitumor agents on DNA: the ellipticine series. *Arch. Biochem. Biophys.* 259, 1–14 (1987) - převzato z 53 a 56
58. DeMarini, D. M., Abu-Shakra, A., Gupta, R., Hendee, L. J., Levine, J. G.: Molecular analysis of mutation induced by the intercalating agent ellipticine at the

- hisd3052 allele of salmonella typhimurium TA98. Environ. Mol. Mutagen. 20, 12-18 (1992)
59. Singh, M. P., Hill, G. C., Peoc'h, D., Rayner, B., Imbach, J. L., Lown, J. W.: High-field NMR and restrained molecular modeling studies on a DNA heteroduplex containing a modified apurinic abasic site in the form of covalently linked 9-aminoellipticine. Biochemistry 33, 10271–10285 (1994) - *převzato z 56*
60. Froelich-Ammon, S. J., Patchan, M. W., Osheroff, N., Thompson, R. B.: Topoisomerase II binds to ellipticine in the absence or presence of DNA. Characterization of enzyme-drug interactions by fluorescence spectroscopy. J. Biol. Chem. 270, 14998–1504 (1995)
61. Ohashi, M., Sugikawa, E., Nakanishi, N.: Inhibition of p53 protein phosphorylation by 9-hydroxyellipticine: a possible anticancer mechanism. Jpn. J. Cancer Res. 86, 819–829 (1995)
62. Schwaller, M. A., Allard, B., Lescot, E., Moreau, F.: Protonophoric activity of ellipticine and isomers across the energy-transducing membrane of mitochondria. J. Biol. Chem. 270, 22709–22713 (1995)
63. Stiborová, M., Bieler, C. A., Wiessler, M., Frei, E.: The anticancer agent ellipticine on activation by cytochrome P450 forms covalent DNA adducts. Biochem. Pharmacol. 62, 1675–1684 (2001)
64. Frei, E., Bieler, C. A., Arlt, V. M., Wiessler, M., Stiborová, M.: Covalent binding of the anticancer drug ellipticine to DNA in V79 cells transfected with human cytochrome P450 enzymes. Biochem. Pharmacol. 64, 289–295 (2002)
65. Stiborová, M., Stiborová-Rupertová, M., Bořek-Dohalská, L., Wiessler, M., Frei, E.: Rat microsomes activating the anticancer drug ellipticine to species covalently binding to deoxyguanosine in DNA are a suitable model mimicking ellipticine bioactivation in humans. Chem. Res. Toxicol. 16, 38–47 (2003)
66. Stiborová, M., Breuer, A., Aimová, D., Stiborová-Rupertová, M., Wiessler, M., Frei, E.: DNA adduct formation by the anticancer drug ellipticine in rats determined by ³²P-postlabeling. Int. J. Cancer. 107, 885–890 (2003)

67. Bořek-Dohalská, L., Frei, E., Stiborová, M.: DNA adduct formation by the anticancer drug ellipticine and its hydroxy derivatives in human breast adenocarcinoma MCF-7 cells. *Collect. Czech Chem. Commun.* 69, 603–615 (2004)
68. Stiborová, M., Sejbal, J., Bořek-Dohalská, L., Aimová, D., Poljaková, J., Forsterová, K., Rupertová, M., Wiesner, J., Hudeček, J., Wiessler, M., Frei, E.: The anticancer drug ellipticine forms covalent DNA adducts, mediated by human cytochromes P450, through metabolism to 13-hydroxyellipticine and ellipticine N^2 -oxide. *Cancer Res.* 64, 8374–8380 (2004)
69. Poljaková, J., Stiborová, M.: Peroxidase-mediated ellipticine-DNA adduct formation explains the selective efficiency of this anticancer drug against breast cancer and leukemia. *Chem. Listy* 98, 298 (2004)
70. Poljaková, J., Forsterová, K., Šulc, M., Frei, E., Stiborová, M.: Oxidation of an antitumor drug ellipticine by peroxidases. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacký Olomouc Czech Repub.* 149, 449–453 (2005)
71. Stiborová, M., Poljaková, J., Ryšlavá, H., Dračinský, M., Eckschlager, T., Frei, E.: Mammalian peroxidases activate anticancer drug ellipticine to intermediates forming deoxyguanosine adducts in DNA identical to those found *in vivo* and generated from 12-hydroxyellipticine and 13-hydroxyellipticine. *Int. J. Cancer* 120, 243–251 (2007)
72. Stiborová, M., Bořek-Dohalská, L., Aimová, D., Kotrbová, V., Kukačková, K., Janouchová, K., Rupertová, M., Ryšlavá, H., Hudeček, J., Frei, E.: Oxidation pattern of the anticancer drug ellipticine by hepatic microsomes – similarity between human and rat systems. *Gen. Physiol. Biophys.* 25, 245–261 (2006)
73. Rendic, S., DiCarlo, F. J.: Human cytochrome P450 enzymes: A status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug. Metab. Rev.* 29, 413–80 (1997) - *převzato z 53*
74. Hofle, G., Glase, N., Leibold, T., Sefkow, M.: Epothilone A-D and their thiazole-modified analogs as novel anticancer agents. *Pure Appl. Chem.* 71, 2019–2024 (1999) - *převzato z 68*
75. Fernandez, N., Roy, M., Lesca, P.: Binding characteristics of Ah receptors from rats and mice before and after separation from hepatic cytosols. 7-Hydroxyellipticine as

- a competitive antagonist of cytochrome P-450 induction. Eur. J. Biochem. 172, 585–592 (1988) – *převzato z 129*
76. Goodsell, D. S.: The molecular perspective: Histone Deacetylase. Oncologist 8, 389-391 (2003)
77. Cress, W. D., Seto, E.: Histone deacetylases, transcriptional control and cancer. J. Cell. Physiol. 184, 1-16 (2000)
78. de Ruijter, A. J., van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S., van Kuilenburg, A. B.: Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. Biochem. J. 370, 737-749 (2003)
79. Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., Richmond, T. J.: Crystal structure of the nucleosome core particle at 2,8 Å resolution. Nature 389, 251-260 (1997)
80. Wade, P. A.: Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin. Hum. Mol. Genet. 10, 693-698 (2001) - *převzato z 78*
81. Ito, K., Barnes, P. J., Adcock, I. M.: Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1-beta-induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. Mol. Cell. Biol. 20, 6891 – 6903 (2000) - *převzato z 78*
82. Forsberg, E. C., Bresnick, E. H.: Histone acetylation beyond promoters: long-range acetylation patterns in the chromatin world. Bioessays 23, 820-830 (2001) - *převzato z 78*
83. Chittur, S. V., Sangster-Guity, N., McCormick, P. J.: Histone deacetylase inhibitors: A new mode for inhibition of cholesterol metabolism. BMC Genomics 9, 507-527 (2008)
84. Bjerling, P., Silversterin, R. A., Thon, G., Caudy, A., Grewal, S., Ekwall, K.: Functional divergence between histone deacetylases in fission yeast by distinct cellular localization and *in vivo* specificity. Mol. Cell. Biol. 22, 2170-2181 (2002) - *převzato z 78*
85. Haigis, M. C., Guarente, L. P.: Mammalian sirtuins – emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. Genes Dev. 20, 2913-2921 (2006)

86. Gao, L., Cueto, M., Asselbergs, F., Atadja, P.: Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J. Biol. Chem.* 277, 25748-25755 (2002)
87. Yang, X. J., Seto, E.: The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 206-218 (2008)
88. Marks, P. A., Richon, V. M., Rifkind, R. A.: Histone deacetylase inhibitors: Inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 1210-1216 (2000)
89. Finnin, M. S., Donigian, J. R., Cohen, A., Richon, V. M., Rifkind, R. A., Marks, P. A., Breslow, R., Pavletich, N. P.: Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA a SAHA inhibitors. *Nature* 401, 188-193 (1999)
90. Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M., Beppu, T.: Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both *in vivo* and *in vitro* by trichostatin A. *J. Biol. Chem.* 265, 17174-17179 (1990)
91. Yoshida, H., Sugita, K.: A novel tetracyclic peptide, trapoxin, induces phenotypic change from transformed to normal in sis-oncogene-transformed NIH3T3 cells. *Jpn. J. Cancer Res.* 83, 324-328 (1992)
92. Kijima, M., Yoshida, M., Sugita, K., Horinouchi, S., Beppu, T.: Trapoxin, an antitumor cyclic tetrapeptide, is an irreversible inhibitor of mammalian histone deacetylase. *J. Biol. Chem.* 268, 22429-22435 (1993)
93. Futamura, M., Monden, Y., Okabe, T., Fujita-Yoshigaki, J., Yokoyama, S., Nishimura, S.: Trichostatin A inhibits both ras-induced neurite outgrowth of PC12 cells and morphological transformation of NIH3T3 cells. *Oncogene* 10, 1119-1123 (1995)
94. Richon, V. M., Webb, Y., Merger, R., Sheppard, T., Jursic, B., Ngo, L., Civoli, F., Breslow, R., Rifkind, R. A., Marks, P. A.: Second generation hybrid polar compounds are potent inducers of transformed cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5705-5708 (1996)

95. McBain, J. A., Eastman, A., Nobel, C. S., Mueller, G. C.: Apoptotic death in adenocarcinoma cell lines induced by butyrate and other histone deacetylase inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* 53, 1357-1368 (1997)
96. Richon, V. M., Emiliani, S., Verdin, E., Webb, Y., Breslow, R., Rifkind, R. A., Marks, P. A.: A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 3003-3007 (1998)
97. Cohen, L., Richon, V., Rifkind, R., Marks, P., Desai, D., Amin, S.: Inhibition of *N*-methylnitrosourea-induced tumors by the cytodifferentiating agent, suberanilohydroxamic acid. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 39, 108 (1998) - *převzato z 77*
98. Desai, D., El-Bayoumy, K., Amin, S.: Chemopreventive efficacy of suberanilohydroxamic acid (SAHA), a cytodifferentiating agent, against tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitros-amino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)-induced lung tumorigenesis in female A/J mice. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 40, 2396 (1999) - *převzato z 77*
99. Van Lint, C., Emiliani, S., Verdin, E.: The expression of a small fraction of cellular gene is changed in response to histone hyperacetylation. *Gene Expr.* 5, 245-253 (1996)
100. Nervi, C., Borello, U., Fazi, F., Buffa, V., Pelicci, P. G., Cossu, G.: Inhibition of histone deacetylase activity by trichostatin A modulates gene expression during mouse embryogenesis without apparent toxicity. *Cancer Res.* 61, 1247-1249 (2001) - *převzato z 83*
101. Marks, P., Rifkind, R. A., Richon, V. M., Breslow, R., Miller, T., Kelly, W. K.: Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat. Rev. Cancer* 1, 194-202 (2001) - *převzato z 83*
102. Duenas-Gonzalez, A., Candelaria, M., Perez-Plascencia, C., Perez-Cardenas, E., de la Cruz-Hernandez, E., Herrera, L. A.: Valproic acid as epigenetic cancer drug: preclinical, clinical and transcriptional effects on solid tumors. *Cancer Treat. Rev.* 34, 206-222 (2008)

103. Meunier, H., Carraz, G., Neunier, Y., Eymard, P., Aimard, M.: Pharmacodynamic properties of N-dipropylacetic acid. *Therapie* 18, 435–438 (1963) - *převzato z 102*
104. Doubek, P., Herman, E., Hovorka, J., Praško, J.: Valproát v léčbě bipolární afektivní poruchy. *Psychiat. pro Praxi* 8, 216-221 (2007)
105. Blaheta, R. A., Činátl, J.: Anti-tumor mechanisms of valproate: A novel role for an old drug. *Med. Res. Rev.* 22, 492-511 (2002)
106. Komárek, V., Stopková, P., Suchopár, J., Zahradníková, L., Vendulka, O., Kučera, Z.: Acidum vaploicum/natrii valproas. *Remedia* 1, 14-26 (2006)
107. Hřebáčková, J., Hraběta, J., Eckschalger, T.: Valproic acid in the complex therapy of malignant tumors. *Curr. Drug. Targets.* 11, 361-379 (2010)
108. <http://www.detskaonkologie.cz/pages/neuroblastom.html> (staženo 16.2.2010)
109. Brodeur, G. M.: Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat. Rev. Cancer.* 3, 203-216 (2003) - *převzato z 115*
110. Poljaková, J., Eckschlager, T., Hraběta, J., Hřebáčková, J., Smutný, S., Frei, E., Martínek, V., Kizek, R., Stiborová, M.: The mechanism of cytotoxicity and DNA adduct formation by the anticancer drug ellipticine in human neuroblastoma cells. *Biochem. Pharmacol.* 77, 1466-1479 (2009)
111. Činátl, J. Jr., Činátl, J., Scholz, M., Driever, P. H., Henrich, D., Kabickova, H., Vogel, J. U., Doerr, H. W., Kornhuber, B.: Antitumor activity of sodium valproate in cultures of human neuroblastoma cells. *Anti-Cancer Drugs* 7, 766-773 (1996)
112. Michaelis, M., Doerr, H. W., Činátl, J. Jr.: Valproic acid as anti-cancer drug. *Curr. Pharm. Des.* 13, 3378-3393 (2007)
113. Michaelis, M., Suhan, T., Činátl, J., Driever, P. H., Činátl, J. Jr.: Valproic acid and interferon-alpha synergistically inhibit neuroblastoma cell growth *in vitro* and *in vivo*. *Int. J. Oncol.* 25, 1795-1799 (2004)
114. Furchert, S. E., Lanvers-Kaminsky, C., Juürgens, H., Jung, M., Loidl, A., Frühwald, M. C.: Inhibitors of histone deacetylases as potential therapeutic tools for high-risk embryonal tumors of the nervous system of childhood. *Int. J. Cancer* 120, 1787-1794 (2007)

115. Hřebačková, J., Poljaková, J., Eckschlager, T., Hraběta, J., Procházka, P., Smutný, S., Stiborová, M.: Histone deacetylase inhibitors valproate and trichostatin A are toxic to neuroblastoma cells and modulate cytochrome P450 1A1, 1B1 a 3A4 expression in these cells. *Inderdisc. Toxicol.* 2, 205-210 (2009)
116. Stiborová, M.: Xenobiochemie, přednáška na PřF UK, katedra biochemie, Praha (2009)
117. Stiborová, M., Martínek, V., Rýdlová, H., Koblas, T., Hodek, P.: Expression of cytochrome P450 1A1 and its contribution to oxidation of a potential human carcinogen 1-phenylazo-2-naphthol (Sudan I) in human livers. *Cancer Lett.* 220, 145-154 (2005)
118. Refat, N. A., Ibrahim, Z. S., Moustafa, G. G., Sakamoto, K. Q., Ishizuka, M., Fujita, S.: The induction of cytochrome P450 1A1 by Sudan Dyes. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 22, 77-84 (2008)
119. Fayer, J. L., Petullo, D. M., Ring, B. J., Wrighton, S. A., Ruterbories, K. J.: A novel testosterone 6 β -hydroxylase activity assay for the study of CYP3A-mediated metabolism, inhibition, and induction *in vitro*. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 46, 117-123 (2002)
120. Ejiri, N., Katayama, K., Doi, K.: Induction of CYP3A1 by the dexamethasone and pregnenolone-16 α -carbonitrile in pregnant rat and fetal livers and placenta. *Exp. Toxic. Pathol.* 54, 273-279 (2003)
121. Křížková, J.: Diplomová práce, PřF UK, katedra biochemie, Praha (2006)
122. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J.: Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275 (1951)
123. <http://www.koppel.cz/VSE/files/STP202.htm> (staženo 3.4.2010)
124. <http://iastat.vse.cz/regrese/Regrese7.htm> (staženo 3.4.2010)
125. Kim, M. S., Blake, M., Baek, J. H., Kohlhagen, G., Pommier, Y., Carrier, F.: Inhibition of histone deacetylase increases cytotoxicity to anticancer drugs targeting DNA. *Cancer Res.* 63, 7291-7300 (2003)

126. Hamm, J. T., Ross, D. G., Richardson, V. M., Diliberto, J. J., Birnbaum, L. S.: Methoxyresorufin: an inappropriate substrate for CYP1A2 in the mouse. *Biochem. Pharmacol.* 56, 1657-1660 (1998)
127. Stiborová, M., Martínek, V., Rýdlová, H., Hodek, P., Frei, E.: Sudan I is a potent carcinogen for humans: evidence for its metabolic activation and detoxication by human recombinant cytochrome P450 1A1 and liver microsomes. *Cancer Res.* 62, 5678-5684 (2002)
128. Burger, H. J., Schuetz, J. D., Schuetz, E. G., Guzelian, P. S.: Paradoxical transcriptional activation of rat liver cytochrome P450 3A1 by dexamethasone and the antiglyucocorticoid pregnenolone-16 α -carbonitrile: Analysis by transient transfection into primary monolayer cultures of adult rat hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 2145-2149 (1992)
129. Aimová, D., Svobodová, L., Kotrbová, V., Mrázová, B., Hodek, P., Hudeček, J., Václavíková, R., Frei, E., Stiborová, M.: The anticancer drug ellipticine is a potent inducer of rat cytochrome P450 1A1 and 1A2, thereby modulating its own metabolism. *Drug Metab. Dispos.* 35, 1926-1934 (2007)
130. Stiborová, M.: Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj k poznání mechanismu působení karcinogenů a konstrukce kancerostatik nové generace, Sborník z multioborového semináře „Otevřená věda“, Praha (2005)
131. Dostálová, O.: Jak vzdorovat rakovině. Grada, Praha (1993)
132. Oyama, T., Kagawa, N., Kunugita, N., Kitagawa, K., Ogawa, M., Yamaguchi, T., Suzuki, R., Kinaga, T., Yashima, Y., Ozaki, S., Isse, T., Kim, Y. D., Kim, H., Kawamoto, T.: Expression of cytochrome P450 in tumor tissues and its association with cancer development. *Front. Biosci.* 9, 1967-1976 (2004)
133. Williams, J. A., Phillips, D. H.: Mammary expression of xenobiotic metabolizing enzymes and their potential role in breast cancer. *Cancer Res.* 60, 4667-4677 (2000)
134. Rekha, G. K., Sladek, N. E.: Multienzyme-mediated stable and transient multidrug resistance and collateral sensitivity induced by xenobiotics. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 40, 215-24 (1997)

135. Háčková, M.: Diplomová práce, PřF UK, katedra biochemie, Praha (2008)
136. Kiang, T. K. L., Ho, P. C., Anari, M. R., Tong, V., Abbott, F. S., Chang, T. K. H.: Contribution of CYP2C9, CYP2A6 and CYP2B6 to valproic acid metabolism in hepatic microsomes from individuals with the CYP2C9*1/*1 genotype. *Toxicol. Sci.* 94, 261-271 (2006)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

| Jméno a příjmení | Adresa | Číslo OP | Datum vypůjčení | Poznámka |
|------------------|--------|----------|-----------------|----------|
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |